

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Darstellung und Charakterisierung von Mastzell-Vorläuferzellen in der Maus unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Silke Naumann d'Alnoncourt, geb. Lenz

aus Bochum

Datum der Promotion: 23.06.2019

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	5
Kurzzusammenfassung	6
Abstract	7
1 Einleitung.....	8
1.1 Hämatopoese	8
1.2 Die Mastzelle	11
1.2.1 Verteilungsmuster	11
1.2.2 Mastzellheterogenität.....	12
1.2.3 Funktionen der Mastzelle	13
1.2.4 Relevanz der Mastzelle.....	14
1.3 Stand der Wissenschaft.....	15
1.4 Ziel dieser Arbeit.....	16
1.5 Aufbau des Tierversuches	18
2 Materialien und Methoden	20
2.1 Materialien	20
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	20
2.1.2 Geräte	21
2.1.3 Chemikalien	22
2.1.4 Antikörper	24
2.1.5 Puffer, Medien	24
2.1.6 Hergestellte Puffer, Lösungen, Medien	24
2.1.7 Mäuse	25
2.2 Methoden	25
2.2.1 Gewinnung von Organen	25
2.2.1.1 Knochenmark	25
2.2.1.2 Peritoneale Lavage	26
2.2.1.3 Milz	26
2.2.1.4 Magen-Darmtrakt	26
2.2.1.5 Rückenhaut	26
2.2.1.6 Ohren	26

2.2.1.7	Blutentnahme	27
2.2.2	Knochenmarkrekonstitution	27
2.2.3	FACS-Färbung.....	27
2.2.3.1	Knochenmark	28
2.2.3.2	Milz.....	29
2.2.3.3	Blut	29
2.2.3.4	Peritoneale Lavage	30
2.2.3.5	Ohren	30
2.2.4	FACS-Analyse.....	31
2.2.5	Kryoschnitte und -färbung.....	32
2.2.6	Paraffinschnitte und – färbung	33
2.3	Auswertung	34
2.4	Statistik.....	35
3	Ergebnisse	36
4	Diskussion	54
5	Literaturangaben	61
6	Eidesstattliche Versicherung	68
7	Curriculum Vitae	69
	Danksagung	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Hämatopoese	9
Abbildung 2: Entwicklungsstufen der Mastzelle basierend auf den Annahmen der Arbeitsgruppe Gurish	10
Abbildung 3: Kryoschnittfärbung der Rückenhaut einer mit PMA behandelten Maus	37
Abbildung 4: Mikroskopische Auszählung der Giemsa-Färbung der Rückenhaut der PMA-, DSS- und Kontroll-Gruppe	38
Abbildung 5: Vergleichende FACS-Analyse der Haut – CD45.1 ⁺ vs. CD45.2 ⁺	38
Abbildung 6: Vergleichende FACS-Analyse der CD45 ⁺ FcεRI ⁺ c-kit ⁺ Zellen der Haut	39
Abbildung 7: Vergleichende FACS-Analyse der CD45 ⁺ c-kit ⁺ sca-1 ⁻ β7 ⁺ T1/ST2 ⁺ FcεRI ⁺ Zellen der Haut.....	41
Abbildung 8: Vergleichende FACS-Analyse des Knochenmarks – CD45.1 ⁺ vs. CD45.2 ⁺	41
Abbildung 9: Exemplarisches FlowJo gating des Knochenmarks für CD45 ⁺ Zellen der PMA-, DSS- und Kontroll-Gruppe	43
Abbildung 10: Vergleichende FACS-Analyse der CD45 ⁺ c-kit ⁺ sca-1 ⁻ β7 ⁺ T1/ST2 ^{+/low} FcεRI ^{low} Zellen des Knochenmarks	44
Abbildung 11: Vergleichende FACS-Analyse der CD 45 ⁺ c-kit ⁺ FcεRI ⁺ Zellen im Blut	45
Abbildung 12: Exemplarisches FlowJo gating des Bluts einer mit DSS behandelten Maus	46
Abbildung 13: Vergleichende FACS Analyse der CD45 ⁺ c-kit ⁺ β7 ⁺ sca-1 ⁻ T1/ST2 ⁺ FcεRI ^{+/low} Zellen im Blut	47
Abbildung 14: Vergleichende FACS-Analyse der Milz – CD8a ⁺ und CD4 ⁺	48
Abbildung 15: Vergleichende FACS-Analyse der Milz – CD45.1 ⁺ vs. CD45.2 ⁺ und CD45 ⁺ c-kit ⁺ FcεRI ⁺	49
Abbildung 16: Vergleichende FACS-Analyse der CD45 ⁺ c-kit ⁺ β7 ⁺ sca-1 ⁻ T1/ST2 ⁺ FcεRI ^{+/low} Zellen der Milz	50
Abbildung 17: Mikroskopische Auszählung der Giemsa-Färbung derDünndarmschnitte der PMA-, DSS- und Kontroll-Gruppe	51
Abbildung 18: Vergleichende FACS-Analyse der peritonealen Lavage (PL) – CD45.1 ⁺ vs. CD45.2 ⁺ und der CD45 ⁺ c-kit ⁺ FcεRI ⁺ Zellen.....	52
Abbildung 19: Vergleichende FACS-Analyse der CD45 ⁺ c-kit ⁺ β7 ⁺ sca-1 ⁻ T1/ST2 ⁺ FcεRI ^{+/low} Zellen in der PL	53

Abkürzungsverzeichnis

BaP	basophil progenitor
BMCMC	bone marrow-derived cultured mast cell (Synonym zu BMMC)
BMCP	basophil-mast cell progenitor
BMMC	bone marrow-derived mast cell (Synonym zu BMCMC)
CD4	Oberflächenmarker T-Helferzellen
CD45.1/.2	Oberflächenmarker hämatopoetischer Zellen
CD8a	Oberflächenmarker cytotoxische T-Zellen
CD117/c-kit	Stammzellfaktor-Rezeptor, Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen
CMP	common myeloid progenitor
CMCP	common mast cell progenitor
CTMC	connective tissue mast cell
DSS	Natrium-Dextransulfat (dextran sulfate sodium salt, reagent grade)
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FcεRI	Hoch affiner Fcε-Rezeptor
GMP	granulocyte/macrophage progenitor
HSC	hematopoietic stem cell
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
KM	Knochenmark
MACS	magnetic-activated cell sorting
MC	mast cell
MCP	mast cell progenitor
MMC	mucosal mast cell
MPP	multipotential progenitor
PL	Peritoneale Lavage
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (phorbol 12 myristate 13 acetate)
Sca-1	stem cell antigen 1
SCF	stem cell factor
SSC	side scatter
VEGF	vascular epithelial growth factor

Kurzzusammenfassung

Die Entwicklung der Mastzelle von der Hämatopoese bis zur adulten Zelle ist immer noch Grundlage vieler Diskussionen. In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Experimenten konnte zwar gezeigt werden, dass die Mastzelle eine eigenständige hämatopoetische Zellreihe besitzt, jedoch existieren noch viele Unklarheiten. Das Ziel dieser Arbeit ist es, eine *in vivo* Methode darzustellen, die die Entstehung und das Verteilungsmuster der Mastzellen und Mastzellvorläuferzellen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen abbilden kann.

Es wurde das Knochenmark einer CD45.2⁺ Mausreihe bestrahlt und zerstört, um das Knochenmark mit Knochenmarkzellen von CD45.1⁺ Mäusen zu rekonstituieren. Die Knochenmark-rekonstituierten Mäuse wurden in drei Gruppen unterteilt: in eine Kontrollgruppe und in zwei Gruppen, in denen die Mäuse einem mastzellaktivierenden Reiz ausgesetzt wurden. Zur Aktivierung der Mukosa-assoziierten Mastzellen wurde Natrium-Dextransulfat (dextran sulfate sodium salt, reagent grade, DSS) in das Trinkwasser gegeben, als Reiz für die Hautmastzellen wurde Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (phorbol 12 myristate 13 acetate, PMA) auf die Haut aufgetragen. Nach der Behandlung wurden den Mäusen Proben von Knochenmark, Blut, Haut, Milz, und Darm entnommen, sowie eine peritoneale Lavage durchgeführt. Die Proben wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die erarbeitete Sechsfach-FACS-Färbung zusammen mit einer Dreifach-FACS-Färbung und den histologischen Schnitten das Verteilungsmuster der Mastzellvorläufer abbilden kann und somit eine zu etablierende Färbung für weitere Experimente in der Durchflusszytometrie sein kann.

Es konnte in diesem *in vivo* Experiment bestätigt werden, dass die Mastzellen und die Mastzellvorläufer aus dem Knochenmark stammen. Unter den pathophysiologischen Reizen konnte gezeigt werden, dass es zu einer erhöhten Zellzahl von CD45.2⁺ Zellen, also nicht transplantierten Zellen, in den Organen Haut, Milz und peritonealer Lavage kommt. Ob diese Darstellung belegt, dass gewebeständige Stammzellen, die während der Bestrahlung geruht haben, unter einem adäquaten Reiz sich zu Mastzellvorläuferzellen differenzieren und dann auch in andere Organe einwandern, war nicht die grundlegende Fragestellung dieser Arbeit und muss Grundlage weiterführender Experimente sein.

Abstract

The formation path of the mast cell from hematopoiesis to adult cell is still debated in literature. *In vitro* and *in vivo* studies show that mast cells follow a discrete hematopoietic cell line. However, many points still are unclear. The goal of the present work is to develop an *in vivo* method for investigating mast cells. Its aim is to depict the distribution pattern of mast cells and mast cell progenitors under physiological and pathophysiological conditions.

Therefore, the complete bone marrow of CD45.2⁺ mice was destroyed via irradiation. The mice were then reconstituted with bone marrow of CD45.1⁺ mice. The reconstituted mice were divided in three groups of equal size: an untreated control group and two groups treated with mast cell activating stimuli, respectively. For activating mucosa-associated mast cells, one group was treated with drinking water containing dextran sulfate sodium salt (DSS). The skin on the back and the ears of the mice in the second group was treated with phorbol 12 myristate 13 acetate (PMA) in order to activate mast cells in the skin. At the end of the experiment all mice were killed, and samples were collected from bone marrow, blood, skin, spleen, and intestine. In addition, peritoneal lavage was carried out. All samples were analysed by fluorescence-activated flow cytometry.

The present work demonstrates that the developed six-fold FACS staining in combination with a three-fold FACS staining and histological sections is actually able to depict the distribution pattern of mast cell progenitors. Therefore, the method can be used as base for further experiments in this field.

The bone marrow is confirmed as origin of mast cells and mast cells progenitors by the results of the presented *in vivo* experiments. The results also show an increase in the numbers of CD45.2⁺ cells, i. e. non-transplanted cells, in skin, spleen, and peritoneal lavage after mast cell activating stimuli. Within the scope of the present work it can't be evaluated whether these cells originate from tissue-bound stem cells. Such dormant cells could have survived the irradiation. The applied stimuli could then have initiated the differentiation of these cells into mast cell progenitors. Answering this question was not part of the design of the present work. Finding the answer should be the base of future experiments.

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese

Die in der Blut- und Lymphbahn zirkulierenden Zellen stammen überwiegend aus dem Knochenmark. Das Knochenmark ist der Ort der Hämatopoese. Die hämatopoetischen Stammzellen differenzieren sich in unterschiedliche Zelllinien, die dann als zumeist reife Zellen aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden. Eine Ausnahme sind vor allem die Lymphozyten, die zwar dem Knochenmark entstammen, aber in den lymphatischen Organen heranreifen [1].

Die Zellen, die das Knochenmark verlassen, können ausdifferenzierte Zellen oder Vorläuferzellen, sogenannte Progenitors, sein. Als Progenitor wird die Zelle bezeichnet, die zwar schon Charakteristika einer Zelllinie aufweist, aber in sich noch das Potential trägt, sich in verschiedene Zelltypen auszudifferenzieren. Das heißt, sie ist partiell spezialisiert. Dies unterscheidet den Progenitor bzw. die Vorläuferzelle von den multipotenten Stammzellen der Hämatopoese [1-4].

Von den verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien sind die Reifungs- und Differenzierungsschritte bekannt. Eine Ausnahme bildet die Mastzelle. Auf Grund ihrer Granula wurde sie der hämatopoetischen Reihe der Granulozyten zugeschrieben. Es wurde angenommen, dass sich die Mastzelle aus den Granulozyten, speziell aus den basophilen Granulozyten (vgl. Abb. 1), entwickelt [2]. Dies würde bedeuten, dass die Mastzelle nicht mit einer eigenständigen Zelllinie direkt aus dem Knochenmark stammt, sondern erst ein Entwicklungsschritt ist, nachdem sich die Zelle zu einem basophilen Granulozyten differenziert hat und somit gemeinsame Vorläuferzellen für Basophile und Mastzellen existieren. Die Beziehung zwischen Mastzellen und Basophilen ist seit ihrer Erstbeschreibung Grundlage für viele wissenschaftliche Diskussionen, nicht zuletzt deshalb, weil sich diese Zellen in ihren eigenen Entwicklungslinien biochemisch und funktional stark unterscheiden können [5,6].

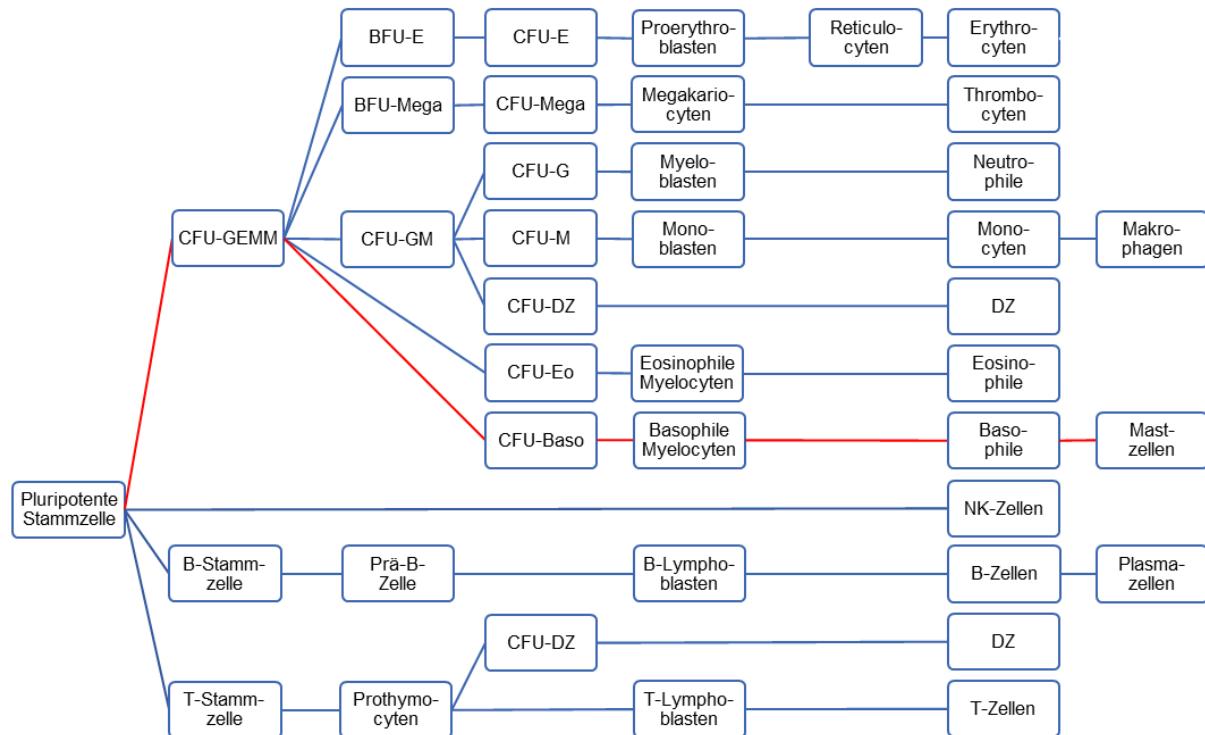


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Hämatopoese

Ein Beispiel für die Darstellung der Hämatopoese, wie sie aktuell in vielen Lehrbüchern noch zu finden ist. Die Mastzelle wird nicht als eigenständige Zelllinie dargestellt, sondern als eine Entwicklungsstufe der Basophilen, wie in [4].

Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass sich mittels der Durchflusszytometrie anhand spezifischer Oberflächenmarker die verschiedenen möglichen Vorläuferzellen trennen und kultivieren lassen können. Kombiniert mit histologischen Färbungen lassen sich die Zellen bestimmten Entwicklungsschritten zuordnen [7].

Die detaillierten Entwicklungsschritte der Mastzelle konnten bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden, so dass ihre Charakterisierung immer noch eine Grundlage für wissenschaftliche Diskussionen bietet.

Experimente der Arbeitsgruppe Kitamura haben in den 1970er Jahren gezeigt, dass die Mastzelle aus dem Knochenmark stammen muss [8,9]. Kitamura transplantierte Knochenmarkszellen einer +/+ Maus in eine Mastzell-defiziente w/w^v Maus. Im Verlauf konnten in der vorher Mastzell-defizienten Maus Mastzellen in der Haut und im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden [8].

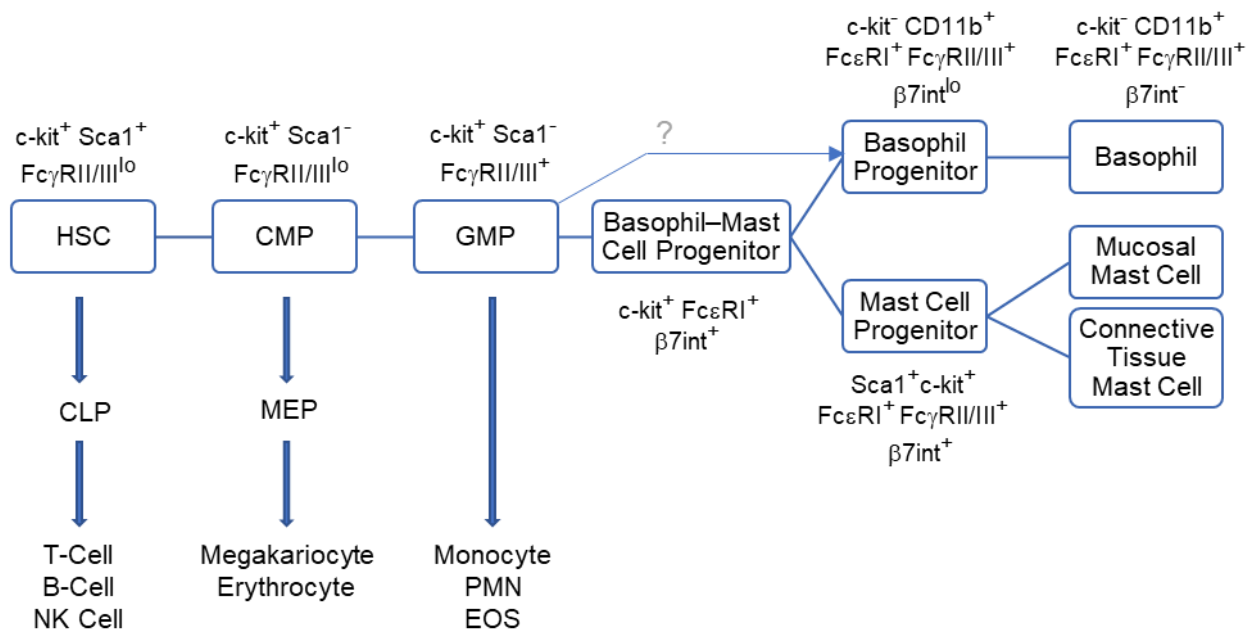


Abbildung 2: Entwicklungsstufen der Mastzelle basierend auf den Annahmen der Arbeitsgruppe Gurish

Ausgehend von ihren *in vitro* Ergebnissen nimmt die Arbeitsgruppe Gurish an, dass ein gemeinsamer Basophilen-Mastzellen-Progenitor existiert. Die Gruppe konnte in *ex vivo* Experimenten zeigen, dass CMP und GMP aus Knochenmarkproben sich zu MCPs entwickeln können. Weiterhin konnte, wie in der Abbildung graphisch dargestellt, gezeigt werden, dass aus der Milz isolierte Progenitors sich nicht nur in MCPs, sondern auch BaPs entwickeln können. Damit konnte ein bipotenter Progenitor für Basophile und Mastzellen postuliert werden, sog BMCP [10].

Bislang konnte allerdings noch nicht eindeutig gezeigt werden, ob die Mastzelle eine vollständig eigene hämatopoetische Zellreihe ist, oder ob sie sich verschiedene Entwicklungsstufen mit der Granulopoese teilt [11]. In Experimenten der Arbeitsgruppe um Galli wurde gezeigt, dass sich Mastzellen *in vitro* aus „common myeloid progenitors“ (CMP) entwickeln und sich in einer eigenen Reihe zu Mastzellen differenzieren. Diese Arbeitsgruppe konnte auf Grundlage ihrer Experimente auch die Hypothese aufstellen, dass zirkulierende „hematopoietic stem cells“ (HSC) sich schnell in MCPs entwickeln können und damit möglicherweise eine Quelle für Mastzellen während einer Infektion darstellen könnten. Die Erfahrungen bezüglich der Kultivierung aus dem Knochenmark gewonnener und *in vitro* kultivierter „bone marrow derived cultured mast cells“ (BMCMC) wurden als Grundlage für die Experimente genommen. In standardisierten Nährlösungen wurden die gewonnenen Zellen entsprechend ihrer Oberflächenmarker sortiert. So konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass β7⁺ T1/ST2⁺ Zellen sich zu Mastzellen entwickeln, während β7⁺ T1/ST2⁻ Zellen sich zu Mastzellen und Makrophagen entwickeln. Die kultivierten „granulocyte/macrophage progenitors“ (GMP) konnten sich unter den gleichen Bedingungen

nicht in Mastzellen differenzieren. Zusammenfassend sind Knochenmarkzellen, die Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁻ Ly6c⁻ FcεRIα⁻ CD27⁻ β7⁺ T1/ST2⁺ sind, Zellen, die sich *in vitro* und *in vivo* zu adulten Mastzellen entwickeln können [12-14].

Demgegenüber stehen die Versuche der Arbeitsgruppe um Gurish, die postulieren, dass eine bipotente Vorläuferzelle nachzuweisen ist, die sich sowohl in basophile Granulozyten als auch in Mastzellen differenzieren kann. Dabei (vgl. Abb. 2) wird angenommen, dass nicht allein das Knochenmark, sondern die Milz eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung dieser Progenitorzelle spielt [10,15].

Übereinstimmend wird in den verschiedenen Versuchen postuliert, dass die Mastzelle als Vorläuferzelle das Knochenmark verlässt und eine Ausdifferenzierung zur adulten Zelle erst im Zielgewebe erfolgt [8,9,16,17].

1.2 Die Mastzelle

Den Begriff Mastzelle prägte Paul Ehrlich, der davon ausging, dass sich die Zelle durch Aufnahme von Granula mästet [18]. Als Erstbeschreiber der Mastzelle gilt Friederich Daniel von Recklinghausen, der die Zellen in seiner Arbeit „Die Lymphgefäße und ihre Beziehungen zum Bindegewebe“ als erster charakterisierte [19]. Seit dieser Erstbeschreibung wird über die funktionelle Rolle der Mastzelle bei physiologischen und pathologischen Prozessen *in vivo* und *in vitro* geforscht. Vor allem die Maus ist als Tiermodell im Rahmen dieser Forschungen etabliert worden. Es konnte gezeigt werden, dass die Funktion der Mastzelle vor allem in der ersten Abwehrreaktion von Bakterien, Pilzen und Parasiten eine entscheidende Rolle spielt [5,20-22]. Die Bedeutung der Mastzelle bei der Immunabwehr, aber auch in der Entstehung und der Unterhaltung von Krankheiten ist komplex und abhängig von ihrer Lokalisation.

1.2.1 Verteilungsmuster

Das Verteilungsmuster der Mastzelle zeigt, dass sich diese Zellpopulation vor allem in Geweben findet, die in unmittelbaren Kontakt mit der Außenwelt stehen, also vor allem in der Haut oder den Schleimhäuten des Gastrointestinaltrakts und der Atemwege [23]. Dabei finden sich die Mastzellen oft assoziiert mit Blutgefäßen und Nerven [24,25]. In parenchymatösen Geweben wie Leber oder Niere finden sich nur geringe Mastzellpopulationen. Im Knorpelgewebe konnten nur selten Mastzellen nachgewiesen werden [26,27]. Auch in der Umgebung von Tumoren spielen die Mastzellen eine Rolle. So produzieren

die Mastzellen unter anderem VEGF (vascular epithelial growth factor) und fördern entscheidend die Angiogenese beim Tumorwachstum [28].

1.2.2 Mastzellheterogenität

Die Mastzelle ist eine langlebige und gewebeständige Zelle, die wie oben erläutert, in fast allen Geweben des menschlichen Körpers vorkommen kann [29]. Dabei haben viele verschiedene Studien nachgewiesen, dass die Mastzelle abhängig von ihrer Lokalisation eine enorme Heterogenität aufweist [5,6,24,30]. Die Fragen nach der Ursache des Verteilungsmusters der Mastzellen im Körper unter pathophysiologischen Bedingungen und den erforderlichen Signalen zur differentiellen Akkumulation in den einzelnen Geweben sind noch nicht abschließend beantwortet.

Im Zytoplasma der Mastzelle finden sich ungewöhnlich viele Granula, in denen vor allem Histamin und Heparin sowie auch Tryptase und Chymase gespeichert sind. Der Inhalt der Granula unterscheidet sich stark, je nachdem, in welchem Gewebe sich die Mastzelle zu einer gewebsständigen Zelle ausdifferenziert hat. Es konnte gezeigt werden, dass es in der Haut vorwiegend Tryptase- und Chymase-positive Mastzellen gibt, während in der Lunge vorrangig Chymase-negative Mastzellen zu finden sind [7,31-33].

Es werden beim Menschen drei Mastzellsubtypen unterschieden. Als T-Mastzellen bezeichnet man Mastzellen, die Tryptase, aber keine Chymase enthalten, als TC-Mastzellen Zellen, die beides enthalten, und als C-Mastzellen die, die keine Tryptase, sondern nur Chymase enthalten [34].

Im Mausmodell werden „connective tissue mast cell“ (CTMC) von „mucosal mast cell“ (MMC) unterschieden, nicht nur auf Grund ihrer Lokalisation, sondern auch bezüglich ihrer Morphologie, Sekretion und Funktion [35].

Neben ihren sekretorischen Granula besitzen die adulten Mastzellen den hochaffinen $Fc\epsilon$ -Rezeptor ($Fc\epsilon RI$), mit dem sie an monomere IgE-Antikörper binden. Eine Antigenvernetzung dieser gebundenen IgE-Antikörper bewirkt eine schnelle Degranulation, bei der vor allem die entzündungsfördernden Mediatoren in das umliegende Gewebe freigesetzt werden [36-38]. Diese Aktivierung über $Fc\epsilon RI$ ist gut untersucht. Mastzellen können aber auch durch zahlreiche IgE-unabhängige Mechanismen wie Komplementfaktoren, Zytokine und Neuropeptide aktiviert werden [39].

Die Mastzellheterogenität zeigt sich auch in den Immunantwortmöglichkeiten zwischen den Spezies Mensch und Maus. Zum Beispiel wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt,

dass spezifische Oberflächenmarker, die Basophilen wie Mastzellen gemein sind, nicht auf eosinophilen Granulozyten nachzuweisen sind [40]. Hier unterscheidet sich die menschliche Pathophysiologie von der murinen Immunantwort. So ist die Mitwirkung von eosinophilen Granulozyten beim Asthma bronchiale des Menschen entscheidend, während Mäuse über keine eosinophilen Granulozyten verfügen [36].

1.2.3 Funktionen der Mastzelle

Auf Grund ihrer Lokalisation reagiert die Mastzellen als eine der ersten Zellen im Rahmen der Immunabwehr. Bei parasitären Infektionen scheint die Aufgabe der Mastzellen darin zu bestehen, die Aktivität des Immunsystems auf die lokale Infektion zu richten [35]. Die Degranulation der Mastzelle löst eine Entzündungsreaktion aus. Die Aktivierung der Mastzelle bewirkt zudem die Synthese von Prostaglandinen, Leukotrienen und Cytokinen [36].

Die allergische Entzündungsreaktion geschieht in zwei Phasen. Eine Sofortreaktion beginnt innerhalb von Sekunden, eine Spätreaktion entwickelt sich erst nach acht bis zwölf Stunden. Die Sofortreaktion ist gekennzeichnet durch die Aktivität von Histamin und Prostaglandinen, einhergehend mit einer Kontraktion der glatten Muskulatur und einer Zunahme der Gefäßpermeabilität. Die Spätreaktion wird durch die von den Mastzellen synthetisierten Prostaglandine, Leukotrine, Chemokine und Cytokine wie IL-5 und IL-3 ausgelöst. Die Spätreaktion kann sich zu einer chronischen Entzündung entwickeln, die durch das Auftreten von T-Effektorzellen gekennzeichnet ist [36]. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem Haut-Mastzellen mit T-Zell-Reaktionen in enger Verbindung stehen [41].

Allergische Reaktionen entstehen aufgrund der Produktion von spezifischen IgE-Antikörpern gegen häufig harmlose Antigene. Dabei sind sogenannte Allergene kleine Antigene, die normalerweise keine IgE-Antikörperantwort auslösen sollten. Eosinophile Granulozyten, Mastzellen und basophile Granulozyten verursachen bei diesen allergischen Reaktionen Entzündungen, die mit Gewebeschäden einhergehen können. Diese Rolle der Mastzelle in der allergischen Reaktion ist ein Grund gewesen, weshalb sich Forscher mit der Biologie der Mastzelle beschäftigt haben, um durch das erlangte Verständnis Wege zu finden, die Reaktion der Mastzelle zu beeinflussen und zu regulieren [35].

Die Mastzelle hat funktionelle Einflüsse auf viele Organe, sie initiiert und unterhält entzündliche und immunologische Reaktionen, ist an neoplastischen Geschehen beteiligt,

kann durch Freisetzung von Mediatoren vasoaktiv wirken und soll auch bei der Wundheilung beteiligt sein [42].

1.2.4 Relevanz der Mastzelle

Die Freisetzung von Histamin und anderen proinflammatorischen Mediatoren aus Mastzellen ist entscheidend an vielen allergischen und chronisch-entzündlichen Erkrankungen beteiligt [7,43]. So werden das chronische Asthma bronchiale [44] und die Urticaria [45] unter anderem durch Mastzellen bedingt und unterhalten. Stark erhöhte Mastzellzahlen sind auch bei chronischer Glomerulonephritis der Niere [46], multipler Sklerose im Gehirn [47,48] und in der Umgebung von Tumoren zu finden. In der Pathogenese der Psoriasis-Arthritis spielen vor allem die Mastzellen, die große Mengen TNF α freisetzen, eine entscheidende Rolle [49]. Auch bei der nicht mit Psoriasis assoziierten Arthritis konnte gezeigt werden, dass die Mastzelle eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Entzündung innehat [50]. Es konnte gezeigt werden, dass sich bei Mäusen, die nicht über Mastzellen verfügen, in dieser Form keine Arthritis manifestieren konnte. In einem Mausmodell der septischen Peritonitis konnte gezeigt werden, dass der Wildtyp ein wesentlich besseres outcome zeigte als die Mastzell-defiziente Maus [51].

Die Mastozytose ist eine klonale Erkrankung der Mastzelle. Sie ist gekennzeichnet durch ein breites Spektrum klinischer Symptome. Die Mastozytose kann in eine kutane und eine systemische Form unterschieden werden [52].

Anhand der Ergebnisse vieler klinischer und experimenteller Arbeiten konnte die Vielfalt pathophysiologischer Funktionen der Mastzellen während allergischer Reaktionen und Mastzell-vermittelter Erkrankungen dargestellt und konkretisiert werden, ohne abschließend die komplexen Funktionen der Mastzellen in der Physiologie wie Pathophysiologie klären zu können. Das Rätsel um die Komplexität der Mastzelle, wie es 1954 von Riley benannt wurde, besteht weiterhin [24].

Den exakten Entstehungsmechanismus der Mastzelle beschreiben zu können, ist entscheidend für die Differenzierung physiologischer Zustände von pathophysiologischen Prozessen. Wenn es möglich wäre, die Mastzellantwort und die Migration der Mastzelle in das Ziel-Gewebe zu beeinflussen, könnte spezifisch in die Krankheitsprozesse der oben genannten und vieler weiterer Erkrankungen eingegriffen werden und deren Verlauf moduliert werden. Dabei könnten sowohl der Ursprungsort, als auch die ausgeschwemmten Vorläuferzellen im Blut und deren Übertritt in das betroffene Gewebe Ziele einer

pharmakologischen Therapie sein.

1.3 Stand der Wissenschaft

Es ist bisher noch nicht gelungen, *in vivo* die Vorstufen der Mastzelle zu identifizieren, welche die auf *in vitro* Experimenten basierenden Theorien bezüglich eines common-mastcell progenitor (CMCP) oder eines basophil-mastcell progenitor (BMCP) bestätigen könnten. Es wurde auf verschiedene Weisen versucht, die Zellen durch den Körper zu verfolgen, jedoch konnten bis jetzt die ursprünglichen Zellpopulationen *in vivo* weder in Mäusen noch in Menschen sicher identifiziert werden [10,12,13,15].

In den bisherigen Versuchen konnte ein Unterschied zwischen der Mastzellentwicklung und –verteilung in homöostatischer Immunlage und unter inflammatorischen Bedingungen gezeigt werden. Die Mechanismen, nach denen es zu diesen Unterschieden kommt, konnten nicht hinreichend dargestellt werden und blieben größtenteils ungeklärt [53].

Es sind viele Oberflächenmarker bekannt, mithilfe derer sich Mastzellen unterschiedlicher Entwicklungsstufen darstellen lassen. Allerdings konnte auch anhand der gefundenen Marker kein eindeutiger Beweis dafür gefunden werden, dass Mastzellen im Gewebe proliferieren, oder dafür, dass bei einer Immunantwort aus dem Knochenmark oder der Milz vermehrt Vorläuferzellen ins Blut und somit letztendlich in das erkrankte Gewebe emigrieren [10,12,13,15,40].

Die Mechanismen, die zu einem sogenannten „homing“ der Zellen in das Zielgewebe führen, sind komplex und passen sich den verschiedenen Konditionen des Körpers an. Unter normalen Umständen führen sie zu einer konstanten Mastzellzahl im Körper. So postulieren einige Gruppen, dass während einer allergischen Reaktion oder eines Parasitenbefalls diese homing-Mechanismen dazu führen, dass es zusätzlich zur lokalen Mastzellproliferation auch zu einer Mastzellprogenitor-Migration kommt [25].

Es ist bekannt, dass $\alpha 4 \beta 7$ durch MCPs exprimiert wird, um in den Darm zu gelangen [15]. Allerdings ist nicht der Beweis geführt worden, dass dies auch für die MCPs der Haut gilt. In vielen Publikationen wird Integrin $\beta 7$ benutzt, um die Vorläuferzellen im Körper verfolgen zu können. Es konnte nicht sicher gezeigt werden, ob die Zellen aus dem Knochenmark oder aus der Milz stammen [15,54].

Die Haut selbst besitzt Stammzellen, die möglicherweise in der Lage sind, sich in Mastzellen zu differenzieren. Ein Nachweis von Mastzellstammzellen in der Haut *in vivo* ist bislang nicht hinreichend gelungen [55].

Die Grundlagenforschung zur Mastzellenforschung wird vor allem an Mäusen durchgeführt. Anfang der 1980er Jahre konnte ein Mausmodell etabliert werden, welches durch eine Doppelmutation des Kit-Gens keinen funktionellen SCF-Rezeptor ausbilden kann, wodurch die Mäuse praktisch keine Mastzellen bilden können. So ist es möglich, die Immunreaktion physiologisch und pathophysiologisch im Vergleich zwischen einer Maus mit Mastzellantwort und einer Maus ohne Mastzellantwort zu erforschen. Weiterhin konnte man zudem durch Zelltransplantation den Weg der Mastzelle und ihr Verteilungsmuster untersuchen [8,56,57].

Zwei Möglichkeiten stehen für die Rekonstitution einer Mastzell-defizienten Maus zu Verfügung. Zum einen kann das vollständige Knochenmark einer Wildtyp-Maus transplantiert werden, zum anderen können *in vitro* aus dem Knochenmark einer Wildtyp-Maus bone marrow-derived mast cells (BMMC) kultiviert und dann transplantiert werden.

In einem sehr elegant angelegten Versuch konnte gezeigt werden, dass BMMC in der Lage sind, Mastzell-defiziente Mäuse zu rekonstituieren, aber nicht in der Lage sind, die für die Lungen spezifischen Mastzellen zu rekonstituieren. Es wurde gefolgert, dass zwischen dem Verlassen des Knochenmarks und der Lungenbesiedlung die Vorläufer der Mastzellen noch spezifisch geprägt werden müssen. Diese Art von Prägung scheint nicht bei BMMC möglich zu sein [58].

Wie mehrfach angeführt, ist die Heterogenität der Mastzelle noch Grundlage vieler wissenschaftlicher Diskussionen, sie bleibt als Rätsel bestehen, wie es Riley in den 50er bereits in einer Veröffentlichung formulierte [24]. Als Ursache dieser Heterogenität oder auch Flexibilität der Mastzelle wurde diskutiert, inwiefern die verschiedenen Mastzelltypen verschiedene Reifungsstadien derselben Zelllinie darstellen und diese sich abhängig vom microenvironment verschiedenartig ausdifferenzieren, oder ob sie von unterschiedlichen Progenitorzellen abstammen [59-61].

1.4 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, eine *in vivo* Methode zu finden, mit deren Hilfe sich die Mastzellvorläuferzellen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen charakterisieren und verfolgen lassen. Anhand dieser *in vivo* Methode soll des Weiteren das Verteilungsmuster der Mastzellen und ihrer Vorläuferzellen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen dargestellt werden.

Es werden Knochenmark, Milz, Blut, peritoneale Lavage und Haut der Versuchstiere auf

das Vorhandensein und die Verteilung von Mastzell-Vorläuferzellen untersucht. Zuvor erfolgt eine Induktion chronisch entzündlicher Prozesse in zwei verschiedenen Organsystemen: in der Haut und im Gastrointestinaltrakt. Dies ist erforderlich, weil zwei adulte Mastzelltypen, „connective tissue type“ Mastzellen (Vorkommen in der Haut) und „mucosa type“ Mastzellen (Vorkommen im Gastrointestinaltrakt) der Maus unterschieden werden können [62]. Es konnte bislang nicht hinreichend geklärt werden, wo die Schnittstelle dieser beiden Mastzelltypen zu finden ist und wie sich die Entwicklung und Migration beider Typen unterscheidet.

Um den Weg der Mastzelle und ihrer Vorläuferzellen verfolgen zu können, wurde das Knochenmark von CD45.2⁺ Mäusen mittels Bestrahlung zerstört und das Knochenmark von CD45.1⁺ Mäusen transplantiert. Theoretisch sollten nach Abschluss der Rekonstitution in dieser Chimäre alle CD45.1⁺ Zellen aus dem Knochenmark stammen.

Kein Versuch wurde bisher so angelegt, dass die Vorläufer der Mastzellen *in vivo* unter verschiedenen Bedingungen, jedoch zu einem festgelegten Zeitpunkt und mit einem festen Satz an Oberflächenmarkern in verschiedenen Organen dargestellt werden konnten. Dabei ist die Auswahl der Oberflächenmarker ein Konsens aus den Publikationen der letzten Jahre.

Bislang ist es nicht gelungen, in einer Messung bei einem *in vivo*-Experiment alle relevanten Oberflächenmarker gemeinsam darzustellen. In eigenen Vorexperimenten zu dieser Arbeit wurde eine Sechsfach-FACS-Färbung etabliert, um mit einer einzigen Messung alle relevanten Oberflächenmarker darstellen zu können.

Der Oberflächen-Marker CD45.1 bzw. CD45.2 hämatopoetischer Zellen wurde gewählt, um die transplantierten Zellen im Gewebe sicher wiederfinden zu können.

Der Oberflächenmarker CD117, der c-kit entspricht, ist ein Stammzellerfaktor-Rezeptor aus der Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie. Durch seinen Liganden, dem Stammzellerfaktor (SCF), spielt er eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und der Differenzierung von Zellen. Für die Bestimmung von Mastzellen ist er obligatorisch, sowohl für juvenile wie auch für adulte Mastzellen [12,13,63].

Der Oberflächenmarker $\beta 7$ ist ebenfalls ein obligater Mastzellmarker. Dieser Rezeptor kann, wie viele andere Oberflächenrezeptoren, in seiner Expression reguliert werden. In vielen Publikationen werden vor allem die Progenitorzellen als $\beta 7^+$ charakterisiert und $\beta 7$ als essentiell für das „homing“ und das „recruitment“ nicht nur von Mastzellen betrachtet [12,13,15,53,63,64].

Der Oberflächenmarker FcεRI ist ein zellmembranständiger Rezeptor, der mit hoher Affinität den Fc-Anteil des IgE-Antikörpers bindet und zu einer Aktivierung der Mastzelle führen kann. Auch dieser Marker ist obligat für die Charakterisierung einer Mastzelle [23,37], wobei postuliert wird, dass diese positiven Zellen zumeist schon adulte Zellen sein müssten. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Marker bei MCPs aus dem Knochenmark negativ sein kann [12]. In einem anderen Versuchsaufbau wurde gezeigt, dass bei MCPs aus der Milz dieser Marker positiv sein kann [65].

Der Oberflächenmarker Sca-1 („stem cell antigen 1“) ist ein Oberflächenprotein. Mit Hilfe von sca-1 lassen sich hämatopoetische Zellen identifizieren und er kann zur Abgrenzung von Stammzellen gegenüber Vorläuferzellen dienen. Dem entsprechend sind die Vorläuferzelle der Mastzelle sca-1 negativ [12].

IL-33 ist der spezifische Ligand des T1/ST2-Rezeptors, der sowohl auf Mastzellen als auch auf Th2-Zellen exprimiert wird [66]. Bindet IL-33 am Rezeptor, aktiviert es die Zelle. Im Mausmodell ist T1/ST2 ein Zelllinienmarker für Mastzell-Vorläuferzellen [67].

1.5 Aufbau des Tierversuches

Wie bereits ausgeführt sind Mastzellen immunologische Zellen. Ohne einen adäquaten Reiz ruhen sie in den verschiedenen Geweben. Um Vorläuferzellen nachweisen zu können, muss in einem Mausmodell ein adäquater Reiz gesetzt werden, um eine Proliferation, Neubildung und/oder Rekrutierung, und damit eine Akkumulation von Mastzellen hervorzurufen. Da es, wie schon beschrieben, verschiedene Gewebsmastzellen gibt, wurden zwei verschiedene Reize ausgewählt.

Als äußerer Reiz, der auf die Haut aufgetragen wird, dient die Chemikalie PMA (phorbol 12 myristate 13 acetate). Als innerer Reiz, um die Darmschleimhäute zu erreichen, dient die Chemikalie DSS (dextran sulfate sodium salt, reagent grade), die dem Trinkwasser hinzugefügt wird. Beide Modelle sind etablierte Verfahren, um eine assoziierte Mastzellakkumulation in erkrankten Geweben zu untersuchen. Bislang wurde nicht untersucht, wie diese Akkumulation zustande kommt, das heißt, ob Mastzellen in das Gewebe einwandern oder gewebeständige Mastzellen proliferieren. Wenn zum Beispiel die Haut selbst in der Lage wäre, Mastzellen bzw. deren Vorläuferzellen zu produzieren, so müssten sich die Verteilungsmuster der Mastzellen nach Setzung der beiden Reize in Haut, Knochen, Milz, peritonealer Lavage und Blut signifikant unterscheiden.

Um im Gewebe die Vorläuferzellen sicher identifizieren zu können, müssen diese Zellen

nicht nur bestimmte Oberflächenmarker besitzen, sie müssen auch so markiert sein, dass man ihre Herkunft bestimmen kann. Um das zu gewährleisten, wurde eine Knochenmarktransplantation als Methode gewählt.

Das Knochenmark der Empfängerermäuse C57BL/6J (CD45.2) wird durch eine Bestrahlung zerstört. Das Ausmaß einer Strahlenschädigung hängt unter anderem von der Strahlensensibilität des Gewebes ab. Wechselgewebe, also Gewebe mit hohen Zellteilungs-raten wie Knochenmark oder Schleimhäute, sind besonders strahlensensibel. Stabile Gewebe, wie Leber und Niere, und Ruhegewebe, wie Nerven- und Muskelgewebe, sind weniger strahlensensibel. Generell wird die Empfindlichkeit jeder Zelle durch die Zellphase bestimmt, in der sie sich während der Strahlenexposition befindet. Zellen zwischen der G1- und M-Phase sind besonders sensibel [1].

Die etablierte Strahlendosis von 7,5 Gy sollte das Knochenmark der Mäuse vollständig zerstören. Auch eine Schädigung aller Schleimhäute, des lymphatischen Gewebes, der Gonaden und der Haarwurzel ist zu erwarten. Nach der Bestrahlung werden die Mäuse mit dem Knochenmark von Spendermäusen C57BL6 (CD45.1) rekonstituiert und somit eine Chimäre erzeugt.

Es wurden insgesamt zwei Gruppen mit jeweils 12 Mäusen untersucht. Zwischen der Knochenmarkrekonstitution und dem Beginn der Behandlung lagen mindestens 54 Tage, um eine sichere Rekonstitution und entsprechende Immunantwort zu gewährleisten. Jede Gruppe wurde in drei Untergruppen unterteilt. Jeweils vier Mäusen wurden nicht behandelt. Vier Mäuse wurden mit der täglichen Aufbringung von PMA auf Rücken und Ohr und vier Mäuse wurden über das Trinkwasser mit DSS behandelt. Die Behandlung wurde für einen Zeitraum von 14 Tagen geplant. Es wurde den Richtlinien entsprechend Abbruchkriterien für die jeweiligen Versuchsgruppen festgelegt. Da in der Gruppe mit DSS behandelten Mäuse nach 10 Tagen die Abbruchkriterien zum Tragen kamen, wurde auch in den anderen Gruppen die Behandlung auf 10 Tage beschränkt. Dieser Zeitraum wurde auch für den Wiederholungsversuch gewählt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

- Alufolie; Charité Berlin [Deutschland]
- Charité Latex Handschuhe; ECREP, Genoa [Italien]
- Cell Strainer, 40 µm, 70 µm Nylon; BD Bioscience, Bedford [USA]
- Cryo Spray, Instant Freezing Spray; Bio-Optica, Milano [Italien]
- Deckgläschen 24x46 mm; Menzel GmbH, Braunschweig [Deutschland]
- Decosept; Dr. Schuhmacher, Malsfeld [Deutschland]
- Einmalspitzen 1250 µl, 100 µl, 10 µl; Sarstedt, Nümbrecht [Deutschland]
- Einmalspitzen 1000 µl; np nerbe plus GmbH Winsen/Luhe [Deutschland]
- Einbettmedium Limonene Mount; Science Services, München [Deutschland]
- Einbettmedium Mounting Medium; Dako Hamburg [Deutschland]
- Eppi 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml; Sarstedt, Nümbrecht [Deutschland]
- Falcon, 15 ml, 50 ml; BD Bioscience, Bedford [USA]
- Glasware, Charité Berlin [Deutschland]
- Jung Tissue Freezing Medium; Leica Microsystems GmbH, Nussloch [Deutschland]
- Kanülen, 30 G (0,3x13 mm), 25 G (0,5x25 mm), 23 G (0,6x30 mm); BD, Drogheda [Irland]
- Lanzetten für Tiere, GoldenRod animal lancet; MEDIpont Inc., NY [USA]
- Macs Pre-Separation Filters, 30 µm; Miltenyi Biotec [USA]
- Medicons 50 µm steril; BD Bioscience, San Jose [USA]
- Mikrotome Blade A35; Feather, Osaka [Japan]
- Multiwell™ 6 Well 3502; Becton Dickinson Labware, NJ [USA]
- Objektträger, superfrost; Menzel GmbH, Braunschweig [Deutschland]
- Pap Pen; G. Kisker, Steinfurt [Deutschland]
- Parafilm „M“; Bemis Flexible Packaging, Neenah [USA]
- Pipettenspitzen – Biosphere Filter Tips 1000 µl, 100 µl, 10 µl; Sarstedt, Nümbrecht

[Deutschland]

- Polystyrolröhrchen für FACS-Analyse 5 ml; Sarstedt, Nümbrecht [Deutschland]
- Petrischalen (Tissue Culture Dish, Falcon) 100x20 mm; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes [USA]
- Reaktionsgefäße, steril (0,5 ml, 1,0 ml, 2,0 ml); Eppendorf, Hamburg [Deutschland] und Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf [Deutschland]
- Serologische Pipetten 5/10/25 ml; Sarstedt, Nümbrecht [Deutschland]
- Sterifilter VWR Vacuum Filtration System, PES 0,2 µm, 500 ml steril; VWR [USA]
- Spritzen (Syringe) 5 ml, 10 ml; BD, Franklin Lakes [USA]
- Superfrost Plus Objektträger mit Glas 25x75x1 mm; R. Emmendingen [Deutschland]
- Syringe Filcons 70 µm; BD Biosciences, San Jose [USA]
- Trockeneis; Linde [Deutschland]
- Tissue Tek Cryomold Standrad (25x20x5 mm); Sakura Finetek Europe B.V. [Niederlande]
- Tissue Tek III Uni-Cassetts; Sakura Finetek Europe B.V. [Niederlande]
- Tissue Tek III Biopsy-Cassetts; Sakura Finetek Europe B.V. [Niederlande]
- Tissue Tek II Filterblock für Einbettkassetten; Sakura Finetek Europe B.V. [Niederlande]
- Waageschälchen; Charite Zentrallager Berlin [Deutschland]
- Zentrifugenröhrchen, 15 ml, 50 ml; Falcon/BD, Heidelberg [Deutschland]
- Zentrifugenröhrchen, 5 ml; BD, Heidelberg [Deutschland]
- Zellkulturflaschen, steril (7,5 cm², 25 cm², 75 cm²); Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf [Deutschland]

2.1.2 Geräte

- Bestrahlungsgerät; Theratronics [Kanada]
- Bestrahlungsbox; biosep [Frankreich]
- Citadel 1000; Shandon [Italien]
- CO₂-Brutschrank, HeraCell 150; Heraeus, Hanau [Deutschland]
- Durchflusszytometer, FACS-Calibur; BD, Heidelberg [Deutschland]
- Electronicrührer Mono VariMag; H+P Labortechnik GmbH [Deutschland]

- Elektronische Waage, LA 4200 und PT120; Sartorius, Göttingen [Deutschland]
- Eppendorf Pipetten, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl; eppendorf research [Deutschland]
- Feuchtkammer, Charite Berlin [Deutschland]
- iPhone 5, Apple Inc. [Deutschland]
- Parafineinbettung Histocentre2; Shandon [Italien]
- MACS
- Medimaschine; DAKO [Dänemark]
- Mikrotom, Shandon Finesse 325; Thermo Scientific, Walldorf [Deutschland]
- Mikroskop; Zeiss [Deutschland]
- Neubauer-improved, Tiefe 0,1 mm, 1 Großquadrat 1 mm²; Marienfeld, Lauda Königshofen [Deutschland]
- Ohrstanze Fisherbrand Punch; Fisher scientific [Deutschland]
- Paraffinschneider Finesse 325 [Deutschland]
- Paraffin-Streckbad 1092; Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel [Deutschland]
- pH-Meter, PB-11; Sartorius, Göttingen [Deutschland]
- Pipetierhilfe pipetus-akku; Hirschmann Laborgeräte [Deutschland]
- Rasierer, Charité Berlin [Deutschland]
- Restrainer mice, Plas Labs Inc., Lansing [USA]
- Sterilbank, Schutzlufttechnik GmbH [Deutschland]
- Thermolyne nuova II hot plate, sigma-aldrich [Deutschland]
- Tierwaage Kern EMB 2200-0; A. Hartenstein, Würzburg [Deutschland]
- Vortex Mixer; neoLab, Heidelberg [Deutschland]
- Wasserbad, WBT 222; Medingen, Dresden [Deutschland]
- Zentrifuge; Heraeus, Hanau [Deutschland]

2.1.3 Chemikalien

- Aceton; Sigma-Aldrich, Steinheim [Deutschland]
- Aqua Dest. (eigene Zapfanlage); Charite Campus Mitte, Berlin [Deutschland]
- Avidin; Sigma-Aldrich, Steinheim [Deutschland]
- Beta-Mercaptor-Ethanol; Sigma-Aldrich, Steinheim [Deutschland]

- Bovines Serumalbumin; SERVA, Heidelberg [Deutschland]
- DAPI; Sigma-Aldrich, Steinheim [Deutschland]
- Descosept; Dr. Schumacher GmbH, Melsungen [Deutschland]
- Dextran Sulfate Sodium Salt Reagent Grade (DSS); MP Biomedicals, Illkirch [France]
- Dinatriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4 ; Sigma, Deisenhofen [Deutschland]
- Eosin-Phyloxin-Lsg.; Dr. K. Hollborn+Söhne, Leipzig [Deutschland]
- Essigsäure – Acetic Acid 99-100 %; J.T. Baker, Deventer [Holland]
- Ethanol (EtOH) 70 %, 96 %, absolut; Herbeta Arzneimittel, Berlin [Deutschland]
- Giemsa Azur Eosin-Methylenblau-Lsg.; Merck, Darmstadt [Deutschland]
- Hämatoxylin; Merck, Darmstadt [Deutschland]
- Heparin-Natrium 5000 IE 0,2 ml Injektionslsg.; ratiopharm GmbH [Deutschland]
- Isofluran Forene 100 % (v/v) 250 ml; Abbott GmbH&Co.KG, Wiesbaden [Deutschland]
- Fetal Bovine Serum (FCS) 500 ml tested for mycoplasma, tested for endotoxin, Exp.: SEP/2010; biochrom Ag, Berlin [Deutschland]
- KHCO_3 ; Sigma-Aldrich, Steinheim [Deutschland]
- KCl; Sigma-Aldrich, Steinheim [Deutschland]
- KH_2PO_4 ; Sigma-Aldrich, Steinheim [Deutschland]
- Liberase; Merck, Darmstadt [Deutschland]
- NaCl 0,9 % Lösung; Braun, Melsungen [Deutschland]
- Na_2EDTA ; Braun, Melsungen [Deutschland]
- Natriumhydroxid (NaOH) pellets 500 g; Merck, Darmstadt [Deutschland]
- Na_2HPO_4 ; Merck, Darmstadt [Deutschland]
- NH_4Cl ; Merck, Darmstadt [Deutschland]
- Paraffin 57-60° Pastillenform; Merck, Darmstadt [Deutschland]
- Paraformaldehyd (PFA); Sigma-Aldrich, Steinheim [Deutschland]
- Penecellin/Streptavidin; Sigma-Aldrich, Steinheim [Deutschland]
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA); Sigma-Aldrich Steinheim [Deutschland]
- Physiologische Kochsalzlösung, 0,9 % NaCl; Braun, Melsungen [Deutschland]
- Salzsäure HCL; Merck, Darmstadt [Deutschland]
- Sodium Azide (NaN_3) 25 g; Sigma Chemical Co., St. Louis [USA]

- Xylol (Isomere) >98 %; Carl Roth, Karlsruhe [Deutschland]

2.1.4 Antikörper

- $\beta 7$; BD Phamingen™ BD Biosciences [USA], Farbe PerCP
- CD45.1; BD Phamingen™ BD Biosciences [USA]; Farbe PE
- CD45.2; BD Phamingen™ BD Biosciences [USA]; Farbe PE
- CD117; BD Phamingen™ BD Biosciences [USA]; Farbe PeCy7
- CD4; BD Phamingen™ BD Biosciences [USA] Farbe FITC
- CD8a; BD Phamingen™ BD Biosciences [USA] Farbe Pacific Blue (Violett)
- Fc ϵ R1; BD Phamingen™ BD Biosciences [USA], Farbe APC
- Sca-1; BD Phamingen™ BD Biosciences [USA], Farbe APC/Ly7
- T1/ST2; BD Phamingen™ BD Biosciences [USA] Farbe FITC
- PE mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl; Biozol, Eching [Deutschland]
- Fc-Block, purified rat anti-mouse CD16/CD32; BD Bioscience [USA]

2.1.5 Puffer, Medien

- Dulbecco's PBS (1 x) without Ca&Mg, 500 ml; PAA [Australia]
- IMDM with L-Glutamine; PAA Laboratories, Pasching [Austria]
- RBC-Lysis Buffer; eBioscience [USA]
- RPMI 1640 Medium mit 2 g/l NaHCO₃, stabile Lutamin, low endotoxin; biochrome AG
- Trypanblau; Sigma-Aldrich, Steinheim [Deutschland]

2.1.6 Hergestellte Puffer, Lösungen, Medien

- ACK
für 1000 ml: 8,29 g NH₄Cl, 1,0 g KHCO₃, 37,2 mg Na₂EDTA (0.1 M); auf pH 7.2 – 7.4 mit HCl einstellen; auffüllen mit Aqua destillata
- EDTA (0.5 M pH 8)
für 1000 ml: 186,1 g EDTA Disodium Salt, auf pH 8 einstellen mit ca. 20 g NaOH-pellets, auffüllen mit Aqua destillata
- FACS-Medium
für 1000 ml: 10 ml FCS, 40 ml 0.5 M EDTA (pH 8), 2 ml einer 0,1 g/ml NaN₃, auffüllen mit PBS

- Liberasemedium I
100 µl Liberase, 10 ml RPMI 1640 mit 5 % Pen/Strep
- Liberasemedium II
250 ml RPMI 1640 mit 5 % Pen/Strep, 20 ml FCS
- MACS-Medium (1x pH 7,2)
für 1000 ml: 0,5 % BSA, 2 mm EDTA (4 ml 0,5 M EDTA), auffüllen mit PBS
- NaN₃-Lösung
1 g NaN₃, 10 ml Aqua destillata
- PBS (10x pH 7,4)
für 1000 ml: 80 g NaCl, 2,0 g KCL, 14,4 g Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄, auffüllen mit Aqua destilat
- PFA 1 %
für 1000 ml: PFA, auffüllen mit Aqua destillata
- PMA 10 µg/1 ml
für 50 ml: 48,9 ml Aceton, 100 µl PMA

2.1.7 Mäuse

Sowohl die Empfängertiere C57BL/6J Mäuse mit dem Allel CD45.2, auch als Ly5.2 oder Ptprc bezeichnet, als auch die Spendermäuse CD45.1 strain 494 congener C57BL/6 Stamm, auch als C57BL/6-Ly5.1 bezeichnet, stammen von Charles River [USA].

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von Organen

C57BL/6 (CD45.1 und CD45.2) Mäuse wurden mit isofluranhaltigen Dämpfen narkotisiert. Danach wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und anschließend desinfiziert.

2.2.1.1 Knochenmark

Durch Abpräparieren der Haut und Muskulatur um die Basis der Hinterläufe wurden Femur und Tibia freigelegt. Dann, nach erfolgter Dislokierung der Hüfte und dem Abtrennen der Pfoten sowie der Abtrennung der Sehnen und des restlichen Muskelgewebes von den Knochen, wurden Femur und Tibia in 50 ml auf Eis gekühltem BMCMC-

Waschmedium gegeben und in einer Thermobox verpackt.

2.2.1.2 Peritoneale Lavage

Das Abdomen wurde mit einer Quer- und einem Längsschnitt vorsichtig eröffnet, um das Peritoneum zu schonen. Für die peritoneale Lavage wurde zunächst 5 ml Luft in das Abdomen injiziert, danach 5 ml Kochsalzlösung. Durch langsames Schwenken der Maus für ca. 2 min wurden die Zellen aus dem Abdomen gewaschen. Die Lavage wurde dann in ein 15 ml Falcon aufgenommen und auf Eis gestellt.

2.2.1.3 Milz

Die Milz wurde aufgesucht und entnommen. Die Milz wurde für die FACS-Analyse in 20 ml auf Eis gekühltem BMCMC-Waschmedium aufgenommen. Für die Paraffinschnitte wurde die Milz halbiert, in eine Biopsiekassette gelegt und in Formalin eingelegt. Für die Kryoschnitte wurde die Milz halbiert, um dann längs und quer in das Kryomedium eingebettet zu werden.

2.2.1.4 Magen-Darmtrakt

Im offenen Abdomen wurden Magen, Dünndarm und Dickdarm aufgesucht und entnommen. Der Magen wurde mit PBS gesäubert und für die Paraffinschnitte in Biopsiekassetten gelegt. Dann wurden die Kassetten in Formalin eingelegt. Für die Kryoschnitte wurde der Magen in das Kryomedium eingebettet. Dünn- und Dickdarm wurden mit PBS gewaschen und in Abschnitten in Biopsiekassetten gelegt. Dann wurden die Kassetten in Formalin eingelegt. Für die Kryoschnitte wurde die Dünn- und Dickdarmabschnitte in einem Kryomedium eingebettet.

2.2.1.5 Rückenhaul

Der Rücken wurde rasiert. Die Rückenhaul wurde trapezförmig entnommen. Für die Paraffinschnitte wurde die Haut in eine Biopsiekassette gelegt und in Formalin eingelegt. Für die Kryoschnitte wurde die Haut senkrecht in das Kryomedium eingebettet.

2.2.1.6 Ohren

Das Ohr wurde an der Basis entfernt und in 20 ml auf Eis gekühltem BMCMC-Waschmedium transportiert.

2.2.1.7 Blutentnahme

Die Maus wurde mittels Isoflurankurznaarkose betäubt. Der Schwanz der Maus wurde für 3 min in warmes Wasser gehalten. Danach wurde durch eine Inzision an der Schwanzvene mittels Pipette mindestens 1 ml Blut entnommen.

2.2.2 Knochenmarkrekonstitution

Die Empfängermäuse C57BL/6J wurden in der Bestrahlungseinheit mit 7,5 Gy bestrahlt. Die Spendermäuse CD45.1 wurden mittels cervikaler Dislokation getötet, desinfiziert und die Beinknochen wurden entnommen. Durch Abpräparieren der Haut und Muskulatur um die Basis der Hinterläufe wurden Femur und Tibia freigelegt. Nach erfolgter Dislokierung der Hüfte und dem Abtrennen der Pfoten sowie der Abtrennung der Sehnen und des restlichen Muskelgewebes von den Knochen wurden diese in 50 ml auf Eis gekühltem BMCMC-Waschmedium gegeben und unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet. Die Kondylen wurden entfernt, das Knochenmark mit BMCMC-Waschmedium unter Verwendung einer 20 G Kanüle herausgespült und gründlich resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min für 7 min bei 4 °C zentrifugiert, das Zellpellet in 5 ml ACK-Lyse-Puffer für 15 sec resuspendiert. Die Reaktion wurde mit 20 ml PBS gestoppt. Die Zellsuspension wurde durch ein 40 µm Zellsieb gegeben. Danach wurde die Zellsuspension bei 1200 U/min und 4 °C für 10 min zentrifugiert und anschließend die Zellzahl bestimmt. Das Zellpellet mit 6×10^8 Zellen wurde in 3 ml PBS aufgenommen. Jeder Maus wurden 200 µl Zellsuspension mittels Schwanzvenenpunktion transplantiert.

Am 24.06.2011 wurde Gruppe eins und am 11.07.2011 Gruppe zwei bestrahlt und es wurde zeitnah je Maus 200 µl Knochenmark-Zellsuspension, das entspricht 4×10^7 Zellen, transplantiert. Eine Maus verstarb während der Transplantation.

Beide Gruppen wurden 52 bzw. 50 Tage in einem Tierstall der Charité versorgt und regelmäßig begutachtet. Da die Tiere keine Schmerzen hatten und auch sonst eine normale Entwicklung zeigten, wurde in Absprache mit der Tierschutzbeauftragten auf Schmerzmittel, Antibiotika und Vitamine verzichtet.

2.2.3 FACS-Färbung

Die Mehrfachfärbungen sind wie folgt aufgeschlüsselt:

1A CD45.1, CD117, Fc ϵ RI

1B CD45.2, CD117, Fc ϵ RI

- 2A CD45.1, CD117, Fc ϵ RI, β 7, T1/ST2, sca-1
- 2B CD45.2, CD117, Fc ϵ RI, β 7, T1/ST2, sca-1
- 3A CD45.1, CD4, CD8a
- 3B CD45.2, CD4, CD8a

Um das Färbeprotokoll zu evaluieren, wurden nach dem FACS-Durchgang der zweiten Versuchsgruppe die Zellen nochmals mit 20 μ l Fluoreszenzantikörpern nachgefärbt. Dafür wurde die Zellsuspension bei 1200 U/min und 4 °C für 8 min zentrifugiert. Die Zellen wurden mit 20 μ l FACS-Antikörper resuspendiert und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach zwei Waschschritten wurden die Zellen mit 350 μ l FACS-Puffer aufgefüllt und anschließend in der Durchflusszytometrie (FACS-Gerät) untersucht. Dies erbrachte keinen signifikanten Unterschied zu den vorangegangenen Messungen.

Um die gewonnen Gewebe und Zellmaterialien auch später noch sicher zuordnen zu können, erhielt jede Maus eine Typenbezeichnung erhalten. Sowohl die Paraffinschnitte als auch die Kryoschnitte wurden fortlaufend nummerisch geordnet. Dabei wurde jedem Objektträger zusätzlich zu der Maustypenbezeichnung eine Zahl zugeordnet.

2.2.3.1 Knochenmark

Die Beinknochen wurden wie oben beschrieben entnommen und auf Eis transportiert. Die Kondylen wurden entfernt, das Knochenmark mit BMCMC-Waschmedium unter Verwendung einer 20 G Kanüle herausgespült und gründlich resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min für 7 min bei 4 °C zentrifugiert, das Zellpellet in 5 ml ACK-Lyse-Puffer für 15 sec resuspendiert. Die Reaktion wurde mit 20 ml PBS gestoppt. Die Zellsuspension wurde durch ein 40 μ m Zellsieb gegeben. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 50 μ l Fc-Block resuspendiert und für 15 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Danach wurde je 1 ml PBS dazu pipettiert und bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 5 ml FACS-Puffer resuspendiert. Die beschrifteten FACS-Röhrchen wurden mit je 1 ml Zellsuspension befüllt. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit je 10 μ l FACS-Antikörper resuspendiert und für 30 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die FACS-Röhrchen mit 1 ml FACS-Puffer aufgefüllt und bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Nach dem dritten Waschschrift wurden die

Zellpellets mit je 1 ml PBS und je 1 ml 4 % PFA resuspendiert und für 15 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert und mit 350 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Behälter mit den gefärbten Zellsuspensionen wurden in Alufolie eingewickelt im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.2.3.2 Milz

Die Milz wurde wie oben beschrieben entnommen. Die Milz wurde durch ein 100 µm Sieb mittels eines Stempels gedrückt und mit 20 ml PBS durchgespült. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml RBC-Lyse-Puffer resuspendiert und für 4 min im Kühlschrank inkubiert. Die Reaktion wurde mit 20 ml PBS gestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 20 ml FACS-Puffer resuspendiert und durch ein 40 µm Sieb gefiltert und bei 1200 U/min für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 50 µl Fc-Block resuspendiert und für 15 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Danach wurde je 1 ml PBS dazu pipettiert und bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 9 ml FACS-Puffer resuspendiert. Die beschrifteten FACS-Röhrchen wurden mit je 1 ml Zellsuspension befüllt. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit je 10 µl FACS-Antikörper resuspendiert und für 30 min im Kühlschrank bei 4° inkubiert. Danach wurden die FACS-Röhrchen mit 1 ml FACS-Puffer aufgefüllt und bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Nach dem dritten Waschschrift wurden die Zellpellets mit je 1 ml PBS und 1 ml 4 % PFA resuspendiert und für 15 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert und mit 350 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Behälter mit den gefärbten Zellsuspensionen wurden im Kühlschrank bei 4 °C in Alufolie eingewickelt gelagert.

2.2.3.3 Blut

Das Blut wurde in ein 50 ml Falcon überführt und mit 10 ml RBC-Lyse-Puffer pro 1 ml Mäuseblut versetzt. Die Zellsuspension wurde 4 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Das Zellpellet wurde mit 50 µl Fc-Block resuspendiert und für 15 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 30 ml PBS gestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 10 ml FACS-Puffer resuspendiert und durch ein 40 µm Sieb gefiltert und danach bei 1200 U/min und

4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 50 µl Fc-Block für 15 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Danach wurde je 1 ml PBS dazu pipettiert und bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 5 ml FACS-Puffer resuspendiert. Die beschrifteten FACS-Röhrchen wurden mit je 1 ml Zellsuspension befüllt. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit je 10 µl FACS-Antikörper resuspendiert und für 30 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die FACS-Röhrchen mit 1 ml FACS-Puffer aufgefüllt und bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Nach dem dritten Waschschrift wurden die Zellpellets mit je 1 ml PBS und 1 ml 4 % PFA resuspendiert und für 15 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert und mit 350 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Behälter mit den gefärbten Zellen wurden im Kühlschrank bei 4 °C in Alufolie eingewickelt gelagert.

2.2.3.4 Peritoneale Lavage

Die Lavage-Falcon wurden bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 50 µl Fc-Block für 15 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Danach wurde je 1 ml PBS dazu pipettiert und bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 5 ml FACS-Puffer resuspendiert. Die beschrifteten FACS-Röhrchen wurden mit je 1 ml Zellsuspension befüllt. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit je 10 µl FACS-Antikörper resuspendiert und für 30 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die FACS-Röhrchen mit 1 ml FACS-Puffer aufgefüllt und bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Nach dem dritten Waschschrift wurden die Zellpellets mit je 1 ml PBS und 1 ml 4 % PFA resuspendiert und für 15 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert und mit 350 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Behälter mit den gefärbten Zellsuspensionen wurden im Kühlschrank bei 4 °C in Alufolie eingewickelt gelagert.

2.2.3.5 Ohren

Es wurden 6-well-Platten mit 1,5 ml Liberasemedium I pro Vertiefung vorbereitet. Die Ohren wurden von der Basis beginnend gesplittet und mit der Dermis nach unten in das Liberasemedium I gelegt. Die Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für 1,5 h inkubiert. Die Reaktion wurde mit je 1,5 ml Liberasemedium II gestoppt. Die Medicons wurden mit

beiden Ohren einer Maus mit je 1 ml Liberasemedium II beladen. Die Medimaschinen wurden für 7 min angeschaltet. Mit je 10 ml Liberasemedium II wurden die Zellen aufgenommen und durch ein 40 µm Sieb in ein 15 ml Falcon überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 20 ml FACS-Puffer resuspendiert und durch einen 30 µm Sieb gefiltert. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 50 µl Fc-Block für 15 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Danach wurde je 1 ml PBS dazu pipetiert und bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 12 ml FACS-Puffer resuspendiert. Die beschrifteten FACS-Röhrchen wurden mit je 1 ml Zellsuspension befüllt. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit je 10 µl FACS-Antikörper resuspendiert und für 30 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die FACS-Röhrchen mit 1 ml FACS-Puffer aufgefüllt und bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Nach dem dritten Waschschrift wurden die Zellpellets mit je 1 ml PBS und 1 ml 4 % PFA resuspendiert und für 15 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert und mit 350 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Behälter mit den gefärbten Zellen wurden im Kühlschrank bei 4 °C in Alufolie eingewickelt gelagert.

2.2.4 FACS-Analyse

Die Durchflusszytometrie (FACS) ermöglicht es, Informationen über Anzahl, Größe, Granularität und Fluoreszenz von Zellen zu erhalten. Man unterscheidet Durchflusszytometer in Analyser und Sorter. Sorter trennen bzw. sortieren Zellen nach Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität und bieten somit die Möglichkeit der einfachen Separation großer Zellpopulationen. Die hier vorgestellten Daten wurden an einem Analyser (FACS-Calibur) erhoben.

Die zu analysierenden Zellen wurden mit fluoreszierenden Antikörpern gegen bestimmte Zellstrukturen markiert. Die präparierte Zellsuspension wird vom Durchflusszytometer aufgesaugt und die Zellen werden einzeln nacheinander an einem Laserstrahl vorbeigeführt. In Abhängigkeit von Zellgröße, Granularität, der Zelloberfläche und aufgetragenen Fluoreszenz-Antikörpern wird der auftreffende Laserstrahl als Streulicht emittiert und durch das optische Detektionssystem analysiert.

In Vorbereitung der Analyse wurden zunächst die Gewebe unbehandelter Mäuse gefärbt

und analysiert, um für die beiden Hauptversuche ein etabliertes FACS-Protokoll zugrunde legen zu können.

Um Überlagerungen der einzelnen Farben zu vermeiden, wurden zunächst die ungefärbten Zellen sortiert, um die Eigenfluoreszenz der Zellen abschätzen zu können. Im nächsten Schritt wurden die einfachen Färbungen gemessen und die Detektoren entsprechend justiert. Dies wurde aufsteigend bis zur sechsfachen Färbung wiederholt, bis sichergestellt war, dass Störfaktoren reduziert wurden und Überlagerungen minimiert wurden. Die Einstellungen wurden gespeichert und auf die beiden Hauptversuche angewandt.

Die gemessenen Rohdaten wurden mit dem Programm FlowJo bearbeitet und analysiert. Prinzipiell wurden bei jeder Gruppe als erstes die ungefärbten Proben untersucht, um auszuschließen, dass die Zellen eine Eigenaktivität haben und somit alle anderen Messungen verfälschen. Exemplarisch für das Prinzip des gating soll eine der grundlegenden Anfangsanalysen beschrieben werden. Bei dieser Analyse wurde zunächst ein sog. gate um alle Zellen im Graphen SCC und FSC gelegt. Im nächsten Schritt wurden die ausgewählten Zellen mit SCC und CD45.1 als Achsen aufgetragen, die CD45.1⁺ Zellen wurden mit einem gate belegt. Als nächstes wurde analysiert, wie viele Zellen aus dieser Population CD117⁺ und FcεRI⁺ sind. Die gleichen Gates wurden für CD45.2 ausgewählt. Alle weiteren gating wurden nach demselben Prinzip durchgeführt und standardisiert auf alle Rohdaten für die Analyse übertragen. Die daraus entstandenen Messdaten wurden mit dem Programm SPSS zusammengefasst und ausgewertet.

2.2.5 Kryoschnitte und -färbung

Sowohl für die Fixierung als auch für die Färbung wurden die im Labor etablierten Standardprotokolle verwendet. Die Organe wurden direkt bei Entnahme in ein Kryomedium eingebettet und bei -20 °C gelagert. Es wurden 15 µm, 10 µm, 5 µm und 3 µm dünne Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und dann für 10 min in vorgekühltem Aceton bei -20 °C fixiert. Nach der Fixierung mit Aceton wurden die Schnitte wiederum getrocknet und bei -20 °C bis zur Färbung gelagert.

Vor Beginn der Färbung wurden die Schnitte eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur aufgetaut. Die Schnitte wurden mit einem PAP-Pen markiert und mit je einem Tropfen Fc-Block (10 µg/ml) pro markierten Schnitt für 15 min in einer Feuchtkammer inkubiert. Der Fc-Block wurde mit PBS heruntergewaschen. Danach wurde der jeweilige Antikörper (PE) auf die Schnitte aufgetragen und für 30 min in der Feuchtkammer inkubiert. Die

Schnitte wurden mit PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit Avidin (FITC) gefärbt und für 15 min in der Feuchtkammer inkubiert. Die Schnitte wurden mit PBS gewaschen. Dann wurde für 1 min der Schnitt mit Dapi gefärbt und wiederum mit PBS gewaschen. Der Schnitt wurde anschließend in einem Kryomedium eingebettet.

Nach der Färbung wurden die Schnitte unverzüglich am Fluoreszenzmikroskop beurteilt, um das Ausbleichen der Schnitte so gering wie möglich zu halten. Die Kryoschnitte wurden nach Analyse in einem Objektkasten trocken und lichtgeschützt bei -20 °C gelagert. Bei der Fluoreszenzmikroskopie handelt es sich um eine spezielle Form der Lichtmikroskopie. Mit Fluoreszenzfarbstoffen gebundene Antikörper binden spezifisch an die Oberflächenmarker der zu untersuchenden Zellstruktur. Der Fluoreszenzfarbstoff wird dann mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, die dazu führt, dass eine andere Wellenlänge abgestrahlt und durch spezielle Filter sichtbar gemacht wird [4].

Die Färbung wurde zunächst an Schnitten nicht bestrahlter und nicht behandelter Mäuse etabliert. Die zunächst auf 3 µm geschnitten Gewebeschnitte stellten sich für die Darstellung von Mastzellen als zu fein dar. Ebenso ließ sich kein zufriedenstellendes Ergebnis mit 5 µm dicken Gewebsschnitten erreichen. Es ist eine Schnittdicke von 10 µm bzw. 15 µm zu wählen, um eine Mastzelle hinreichend im Gewebe darstellen zu können. Die Färbung mit PE leuchtet rot und markiert die CD45.1⁺ Zellen. Avidin ist eine etablierte Färbemethode, um Mastzellen darzustellen und leuchtet als FITC grün. Ebenfalls etabliert ist zur Darstellung von Zellkernen die blau-erscheinende Markierung mit Dapi; sie dient vor allem zur Auffindung des Schnittes. PE, FITC und Dapi werden zunächst unabhängig voneinander detektiert. Kommt es bei den Messungen zu einer Überlagerung der Farben, ist ein orangefarbiges Leuchten der Mastzellen zu erwarten.

2.2.6 Paraffinschnitte und – färbung

Die in Formalin fixierten Organe wurden mittels eines Einbettungsautomaten (Zitadell) paraffiniert, anschließend in einen Paraffinblock eingebettet und bei Zimmertemperatur trocken gelagert. Es wurden 10 µm, 5 µm und 3 µm dünne Schnitte angefertigt, pro Objektträger wurden drei bis vier Schnitte aufgebracht, fixiert und bei Zimmertemperatur gelagert.

Für die Färbung wurde ein im Labor etabliertes Verfahren angewandt. Die Schnitte wurden dreimal 10 min in aufeinanderfolgende Xylolbehälter getaucht. Danach zweimal 5 min in absolutes Ethanol, zweimal 5 min in 96 % Ethanol und anschließend zweimal

5 min in 70 % Ethanol überführt. Die Schnitte wurde dann dreimal 5 min in Aqua destillata gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 15 min in ein Giemsaabad getaucht. Die Schnitte wurden für 10 sec mit 0,1 % Essigsäure fixiert, dann dreimal für 5 min mit absolutem Ethanol und dreimal für 5 min mit Xylol gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte eingebettet. Die Schnitte wurden in einem Objektkasten trocken und lichtgeschützt gelagert. Dieses Färbeprotokoll wurde mehrfach wiederholt. Nach den ersten Auswertungen der Schnitte wurde in getrennten Versuchen das Giemsaabad um 5 Minuten verkürzt bzw. die abschließende Waschung auf viermal erhöht.

In der Giemsa-Färbung scheinen Zellkerne blau, eosinophile Granulozyten und Granula rot, Mastzellen violett, Melanin grün [1].

2.3 Auswertung

Die Auswertung der Giemsa-Färbung erfolgte am Lichtmikroskop. Bei 400-facher Vergrößerung (40x Objektiv und 10x Okular) wurden im Gesichtsfeld die Mastzellen ausgezählt. Aus den Gesichtsfeldern wurde pro Gewebeschnitt ein Mittelwert errechnet. Die mikroskopischen Photographien wurden mit einem iPhone 5 aufgenommen. Eine Bildbearbeitung erfolgte nicht.

Die Auswertung der Kryoschnitte erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop. Die Schnitte wurden pro Gesichtsfeld ausgewertet und in ihrer Schnittdicke variiert, um optisch die erfolgreiche Bildung einer Chimäre darstellen zu könne. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden mit der integrierten Kamera des Mikroskops aufgenommen. Eine Bildbearbeitung erfolgte nicht.

Die Auswertung der FACS-Rohdaten erfolgte mittels FlowJo. Die FlowJo Ergebnisse wurden mit dem Programm PSPP ausgewertet.

Der Versuch wurde, wie oben erwähnt, zweimalig unter denselben beschriebenen Bedingungen und anschließender Materialgewinnung wie auch Auswertung durchgeführt. Im direkten Vergleich der erhobenen Datensätze beider Versuche zeigte sich kein signifikanter Unterschied, so dass die Daten der beiden Versuche zusammengefasst wurden. Es wurden die Rohdaten von insgesamt 20 Mäuse ausgewertet ($n = 20$), das sind aufgeschlüsselt sechs DSS behandelte Mäuse, sieben behandelte PMA Mäuse und sieben unbehandelte Mäuse. Die Rohdaten dieser 20 Mäuse sind Grundlage der folgenden Ergebnisse und anschließender Diskussion.

2.4 Statistik

Die deskriptive Statistik dient der genauen Beschreibung bereits erhobener Daten aus statistischen Gesamtheiten. Mit ihrer Hilfe können Fakten und Daten für die Analyse aufbereitet werden, um sie auszuwerten sowie systematisch darzustellen.

Das Messniveau dieser Arbeit ist metrisch.

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

Mittels des Zwei-Stichproben-F-Tests kann die Varianz bestimmt werden. Im Falle gleicher Varianzen wird der Student's-T-Test angewandt [68]. Im Falle verschiedener Varianzen wird der Welch's-T-Test angewandt [69]. Eine aktuelle Studie hat jedoch gezeigt, dass der Welch's-T-Test auch im Falle gleicher Varianzen robustere Ergebnisse liefert [70]. Daher wurde in dieser Arbeit auf die vorherige Bestimmung der Varianz bewusst verzichtet, und es wurde direkt der Welch's-T-Test angewandt. Ein daraus resultierender p-Wert mit $p < 0,05$ wurde als signifikant bewertet, ein p-Wert mit $p < 0,001$ als hoch signifikant.

3 Ergebnisse

Dargestellt wird nicht nur die Verteilung der CD45.1⁺ vs. CD45.2⁺ Zellen in den verschiedenen Organen, sondern auch der Weg und die Verteilung der FcεRI⁺ c-kit⁺ Zellen sowie der c-kit⁺ sca-1⁻ β7⁺ T1/ST2⁺ FcεRI^{+/low} Zellen. Die Darstellung der Ergebnisse wird mit dem Zielorgan Haut beginnen. Das Organ Haut wurde in einer Gruppe mit PMA als mastzellspezifischem Hautreiz behandelt und mit den anderen beiden Gruppen, DSS-Behandlung und unbehandelt, verglichen. Die Unterschiede, die hier gefunden werden, werden dann über das Knochenmark, als Startpunkt der Transplantation der CD45.1⁺ Zellen, über die Verteilung im Blut und in der Milz verfolgt und aufgezeigt. Am Ende werden die Ergebnisse des zweiten Zielorgans, dem Magen-Darmtrakt, welcher mit dem Reagenz DSS im Trinkwasser behandelt wurde, dargestellt. Der Vergleich der Ergebnisse wird in der anschließenden Diskussion erfolgen. Die Verteilung der CD45.1⁺ zu den CD45.2⁺ Zellen wird immer erst in Bezug auf die Gesamtzellzahl ausgewertet. Die Verteilung der FcεRI⁺ c-kit⁺ Zellen sowie der c-kit⁺ sca-1⁻ β7⁺ T1/ST2⁺ FcεRI⁺ Zellen wird dann prozentual in Bezug auf die vorher ausgewählten CD45 Zellen dargestellt.

Nach erfolgreicher Rekonstitution einer ursprünglich CD45.2⁺ Maus, das Knochenmark wurde wie oben beschrieben durch Bestrahlung zerstört, durch die Transplantation von CD45.1⁺ Knochenmark, sollten alle Zellen, die aus dem Knochenmark stammen, CD45.1⁺ sein. Ebenfalls CD45.1⁺ sollten somit Zellen sein, die zum Beispiel in ein Gewebe wie die Haut eingewandert sind.

Die Rückenhaut einer Mausgruppe wurde mit dem mastzellspezifischen Reiz PMA behandelt und somit eine Rekrutierung von Zellen in die Haut gefördert. In den histologischen Immunfluoreszenz-Schnitten dieser behandelten Rückenhaut können eindeutig CD45.1⁺ Zellen nachgewiesen werden, wie Abbildung 3 zeigt. Eine Überlagerung der Farben Avidin-Grün, welche Mastzellen anfärbt, und dem PE-Rot des Oberflächenmarker CD45.1 erzeugt die Farbe Orange und markiert damit eine CD45.1⁺ Mastzelle (mit Pfeil markierte Zelle in der Abb. 3). Diese adulte Mastzelle stammt damit eindeutig aus dem Knochenmark. Daneben lassen sich in einigen Hautschnitten auch Mastzellen darstellen, die nicht CD45.1⁺ darstellbar sind und somit nicht orange in der Fluoreszenzfärbung leuchten. In der Immunfluoreszenzfärbung sind damit sowohl CD45.1⁺ als auch CD45.2⁺ Mastzellen nachweisbar.

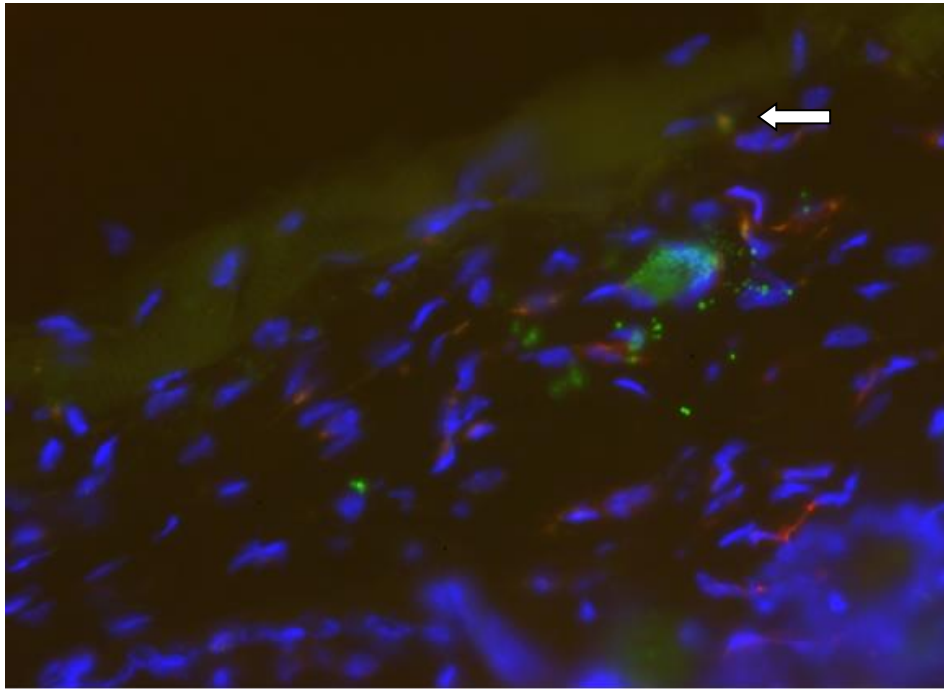


Abbildung 3: Kryoschnittfärbung der Rückenhaut einer mit PMA behandelten Maus

Die Schnittdicke beträgt 10 µm. Die Zellkerne wurden mit Dapi blau markiert. Als grün stellt sich die mit Avidin angefärbte Mastzelle dar. Als rot stellt sich der mit PE angefärbte Oberflächenmarker CD45.1 dar, welcher auf alle transplantierten Zellen zu finden ist. Eine Überlagerung der Farben grün und rot erzeugt orange und markiert damit eine CD45.1⁺ Mastzelle (mit Pfeil markierte Zelle). Eine rein grün angefärbte Zelle ist damit CD45.2⁺. Optisch stellt sich hier die Haut einer Maus-Chimäre bestehend aus CD45.1⁺ und CD45.2⁺ Zellen dar.

In der zweiten histologischen Auswertung wurde die Rückenhaut aller drei Versuchsgruppen mittels Paraffinschnitten und Giemsa-Färbung untersucht. Die Auswertung der histologischen Giemsa-Färbung zeigt unter dem pathophysiologischen PMA-Reiz einen deutlichen Anstieg der Mastzellen pro Gesichtsfeld in der Haut im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Rahmen der Fehlergenauigkeit lässt sich kein deutlicher Unterschied zwischen DSS-Gruppe und PMA-Gruppe feststellen.

Es zeigt sich in der histologischen Auswertung der DSS-Gruppe ein Anstieg der Mastzellen in der Haut. Anders als bei der PMA-Gruppe, stellt sich optisch die Haut der DSS-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe bis auf die erhöhte Mastzellzahl nicht morphologisch verändert dar. Die PMA-Gruppe unterscheidet sich morphologisch deutlich von der Kontrollgruppe und der DSS-Gruppe (vgl. Abbildung 4).

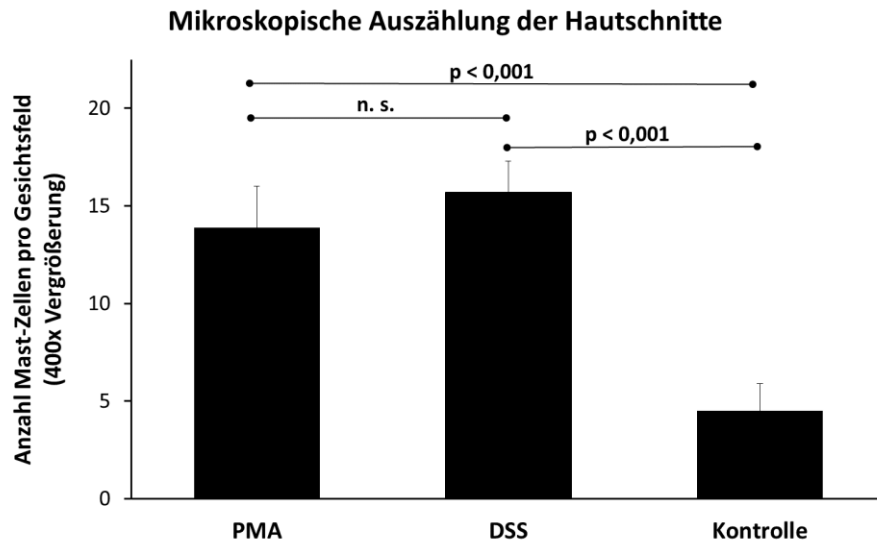


Abbildung 4: Mikroskopische Auszählung der Giemsa-Färbung der Rückenhaut der PMA-, DSS- und Kontroll-Gruppe

Die Haut der drei Mausgruppen wurde mit Giemsa gefärbt und pro Gesichtsfeld bei 400x Vergrößerung ausgewertet (untersuchte Schnitte $n = 55$). In den Übersichtsfeldern unterschied sich die Haut der mit PMA behandelten Mäuse von denen der mit DSS behandelten oder unbehandelten Mäusen schon optisch (siehe Abb. 5). In der mikroskopischen Auszählung zeigt sich zur Kontrollgruppe ein Anstieg der Mastzellen in der Haut der PMA- aber auch in der DSS-Gruppe. Zwischen der PMA- und DSS-Gruppe lässt sich hier kein deutlicher Unterschied in der Anzahl der Mastzellen darstellen.

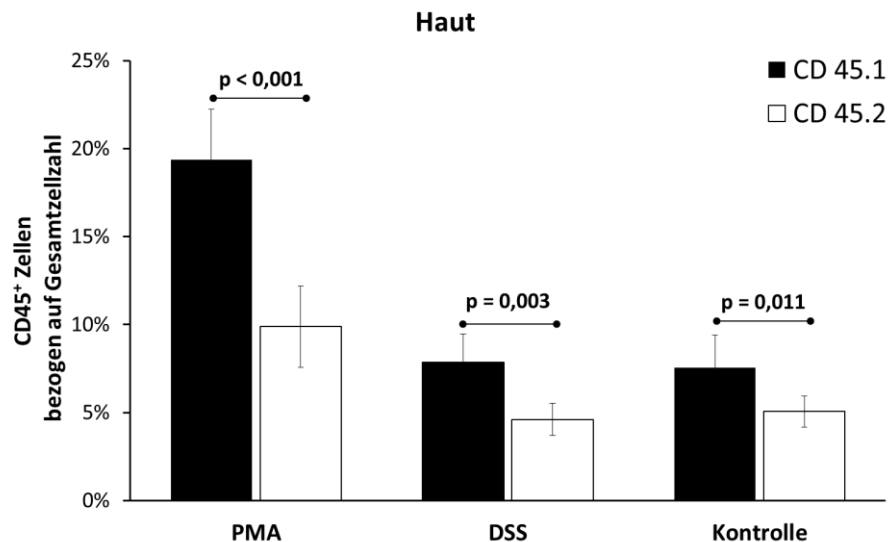


Abbildung 5: Vergleichende FACS-Analyse der Haut – CD45.1⁺ vs. CD45.2⁺

Im Graphen dargestellt sind die CD45⁺ Zellen in der Haut der drei Mausgruppen PMA-, DSS- und die unbehandelte Kontrollgruppe. In schwarz sind die transplantierten CD45.1⁺ Zellen dargestellt, in weiß die CD45.2⁺ Zellen. Die Prozentangabe bezieht sich auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen. Die statistische Auswertung bezieht sich hier auf die Frage des Verhältnisses der CD45.1⁺ zu CD45.2⁺ Zellen.

In der Auswertung der FACS-Rohdaten der Haut lässt sich nicht nur optisch, wie in der Immunfluoreszenzfärbung, die Chimäre darstellen (vgl. Abbildung 3), sondern es lässt sich quantitativ beurteilen und zeigen, wie die CD45.1⁺ und CD45.2⁺ Zellen verteilt sind. In Abbildung 5 ist dargestellt, dass im Zielorgan Haut vor allem in der PMA-Gruppe mehr transplantierte CD45.1⁺ Zellen nachweisbar sind als CD45.2⁺ Zellen. Diese ist auch in der statistischen Auswertung mit p-Werten deutlich unter 0,05 für alle drei Gruppen darstellbar.

In einem zweiten Schritt wurden aus diesen CD45.1⁺ bzw. CD45.2⁺ Zellen die Zellen ausgewählt, die c-kit⁺ FcεRI⁺ sind. Diese Oberflächenmarker sind auf allen Mastzellen vorhanden. Es lassen sich in der PMA-Gruppe, der ein direkter Reiz auf die Haut ist, mehr FcεRI⁺ c-kit⁺ Zellen als in der Kontrollgruppe darstellen, jedoch lässt sich kein deutlicher Unterschied zu der DSS-Gruppe zeigen. Die statistische Auswertung der CD45.1⁺ zu den CD45.2⁺ Zellen zeigt einen signifikanten Unterschied.

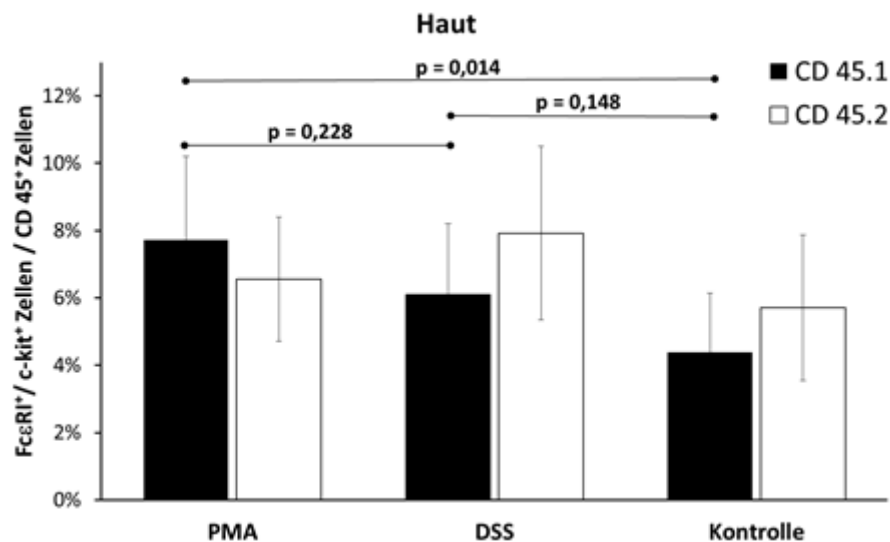


Abbildung 6: Vergleichende FACS-Analyse der CD45⁺FcεRI⁺ c-kit⁺ Zellen der Haut

Im Graphen dargestellt sind die in der Haut nachweisbaren FcεRI⁺ c-kit⁺ Zellen in den drei Versuchsgruppen (PMA-, DSS- und Kontrollgruppe). In schwarz sind die CD45.1⁺ Zellen dargestellt, in weiß die CD45.2⁺ Zellen. Rein graphisch zeigt sich, dass nun mehr CD45.2⁺ Zellen im Gewebe darstellbar sind, jedoch bezieht sich die prozentuale Darstellung auf die vorher ausgewählt CD45-Zellen und nicht auf die Gesamtzahl der Zellen, da nicht die Relation auf die Gesamtzellzahl bedeutend ist, sondern die Frage, welche Zellen sich als CD45.2 darstellen lassen. Auf dem Hintergrund der schon in der Einleitung beschriebenen Theorie, dass sich in der Haut Stammzellen befinden, die in der Lage sind, sich zu adulten Mastzellen zu differenzieren, erscheint diese Darstellung sehr interessant. Da der Focus auf den transplantierten Zellen gelegt werden soll, wurde die statistische Auswertung nur für die CD45.1⁺ Zellen im Vergleich der Gruppen untereinander dargestellt.

Unter Berücksichtigung der Standardabweichung kann in Abbildung 6 gezeigt werden, dass der Anteil CD45.1⁺ zu CD45.2⁺ in der Gruppe der FcεRI⁺ c-kit⁺ Zellen sich nicht signifikant unterscheidet im Vergleich zu der Verteilung bezogen auf die Gesamtzellzahl in Abbildung 5. Im Vergleich der beiden Graphen miteinander ist der Anteil der FcεRI⁺ c-kit⁺ Zellen in der CD45.2⁺ Gruppe höher als in der Gruppe der CD45.1⁺ Zellen. In der statistischen Auswertung der drei Versuchsgruppen untereinander zeigt sich für die CD45.1⁺ Zellen nur zwischen der PMA-Gruppe und der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied.

Die Auswertung der sechsfachen Färbung soll nun zeigen, wie viele Vorläuferzellen sich in der Haut in den drei verschiedenen Versuchsgruppen nachweisen lassen. Im ersten Gating wurden wiederum die CD45.1⁺ bzw CD45.2⁺ Zellen ausgewählt, daraus schrittweise dann die c-kit⁺ sca-1⁻ β7⁺ T1/ST2⁺ FcεRI^{+/low} Zellen. Vergleicht man in Abbildung 7 die Vorläuferzellen der PMA-Gruppe mit knapp unter 1 %, in der DSS-Gruppe mit knapp über 1 % und in der Kontrollgruppe mit 1 % unter Berücksichtigung der Standardabweichung, dann zeigt sich, dass die Zellen in diesen drei Gruppen auf dem gleichen Verteilungslevel sind. Im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe und unter Berücksichtigung der Standardabweichung lässt sich bzgl. der Vorläuferzellen kein signifikanter Unterschied in der Haut darstellen. Im Vergleich der CD45.1⁺ vs. CD45.2⁺ Zellen zeigt sich auch hier ein deutlich erhöhter Anteil an CD45.2⁺ Zellen gegenüber der Verteilung bezogen auf die Gesamtzellzahl.

In der statistischen Auswertung der Verteilung der CD 45.1⁺ vs. CD 45.2⁺ Zellen lassen sich signifikante Unterschiede in PMA-Gruppe darstellen, in der DSS-Gruppe und der unbehandelten Kontrollgruppe lassen sich P Wert um 0,05 zeigen.

Um die Frage zu klären, ob dieses Verteilungsmuster auch in anderen Organen zu finden ist oder ob sich durch das Verteilungsmuster in den anderen Organen eine Erklärung für diese Ergebnisse finden lässt, wurde, wie beschrieben, unter anderem auch das Knochenmark und das Blut der drei Versuchsgruppen untersucht.

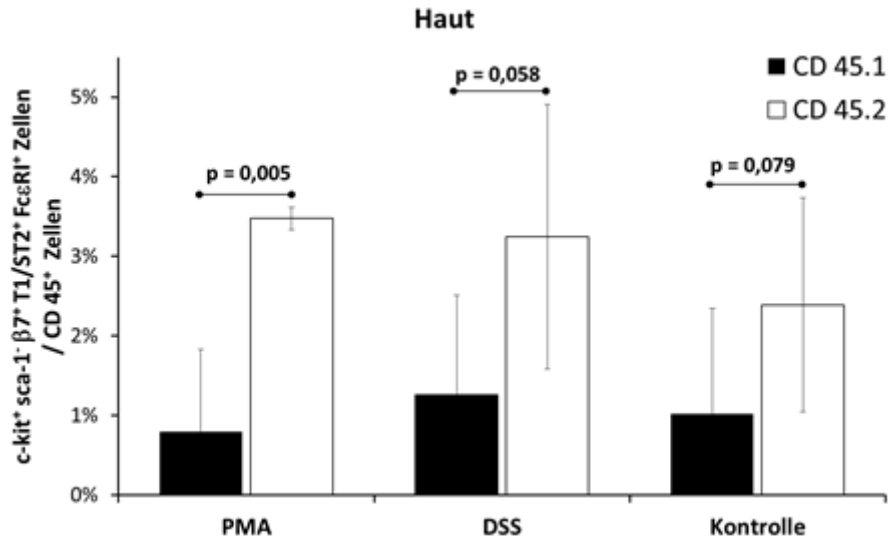


Abbildung 7: Vergleichende FACS-Analyse der CD45⁺ c-kit⁺ sca-1⁻ β7⁺ T1/ST2⁺ FcεRI⁺ Zellen der Haut

Dargestellt sind die c-kit⁺ sca-1⁻ β7⁺ T1/ST2⁺ FcεRI⁺ Zellen, die sich prozentual auf die CD45.1⁺ bzw. CD45.2⁺ Zellen beziehen. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung zeigt sich kein Unterschied zwischen den drei Versuchsgruppen bzgl. der Verteilung der Vorläuferzellen. Vergleicht man die Verteilung der CD45.1⁺ und der CD45.2⁺ Zellen, zeigt sich hier ein statistisch signifikanter Unterschied, der in jeder Versuchsgruppe darstellbar ist und anscheinend unabhängig von der Behandlung ist.

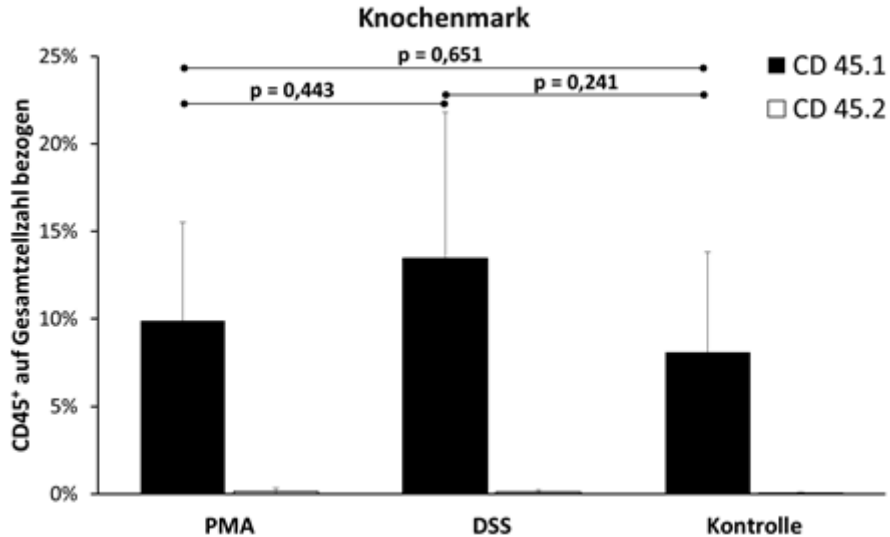


Abbildung 8: Vergleichende FACS-Analyse des Knochenmarks – CD45.1⁺ vs. CD45.2⁺

Im Graphen dargestellt sind CD45.1⁺ vs. CD45.2⁺ Zellen im Knochenmark der drei Mausgruppen (PMA-Gruppe, DSS-Gruppe und unbehandelte Kontrollgruppe). In schwarz sind die CD45.1⁺ Zellen dargestellt, in weiß die CD45.2⁺ Zellen. Die Prozentangabe bezieht sich auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen. Die Werte für die CD45.2⁺ Zellen liegen bei 0,1 % bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen mit einer Standardabweichung im Durchschnitt bei 0,1 %. Die statistische Auswertung der drei Gruppen untereinander zeigt keinen signifikanten Unterschied.

Im Knochenmark zeigt sich in der ersten Darstellung der CD45.1⁺ vs. CD45.2⁺ Zellen wiederum, dass die Transplantation erfolgreich war. Hier liegt der prozentuale Anteil der CD45.2-Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen in allen drei Versuchsgruppen um 0,1 % (siehe Abbildung 8). Im Vergleich dazu liegen die CD45.1⁺ Zellen in der PMA-Gruppe bei 9,9 %, in der DSS bei 13,5 % und in der Kontrollgruppe bei 8,1 %. Betrachtet man das FlowJo-gating CD45.1⁺ vs. CD45.2⁺ für das Knochenmark direkt, zeigt sich in der Verteilung CD45.1⁺ vs. CD45.2⁺ schon rein optisch in der Auswertung ein deutlicher Unterschied. In der statistischen Auswertung der drei Gruppen untereinander zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

In der Abbildung 9 dargestellt sind die gatings CD45.1⁺ vs. CD45.2⁺ einer PMA-Maus gegenüber einer DSS-Maus für das Knochenmark. In beiden Gruppen ist, wie oben beschrieben, zu zeigen, dass sich kaum CD45.2⁺ Zellen im Knochenmark nachweisen lassen.

In der Auswertung der c-kit⁺ FcεRI⁺ Zellen im Knochenmark zeigt sich eine nur geringe Zellzahl, für die PMA-Gruppe 0,4388 %, für die DSS-Gruppe 0,116 % und für die Kontrollgruppe 0,183 % bezogen auf die CD45.1⁺ Zellen mit einer Standardabweichung zwischen 0,05 % und 0,5 %.

In der Darstellung der Vorläuferzellen mit der sechsfachen Färbung der CD45.1⁺ Zellen im Knochenmark zeigt sich, dass in allen drei Versuchsgruppen der Nachweis der Vorläuferzellen unter 0,1 % liegt, so dass in Abbildung 10 nur die CD45.1⁺ Zellen dargestellt sind. Ein Unterschied zwischen PMA-, DSS- und Kontrollgruppe ist statistisch nicht nachweisbar.

Wie in der Einleitung erwähnt, wurde als Grundlage für diesen Versuch eine Maus-Chimäre aus CD45.1⁺ und CD45.2⁺ Zellen erzeugt, um die Möglichkeit zu haben, den Weg der Zellen aus dem Knochenmark in die Zielorgane nachverfolgen und auch das Verteilungsmuster der Zellen charakterisieren zu können. Wie im transplantierten Knochenmark lassen sich auch im Blut im ersten gating der FACS-Untersuchung CD45.1⁺ vs. CD 45.2⁺ Zellen in Bezug auf die Gesamtzellzahl nur wenig CD45.2⁺ Zellen nachweisen.

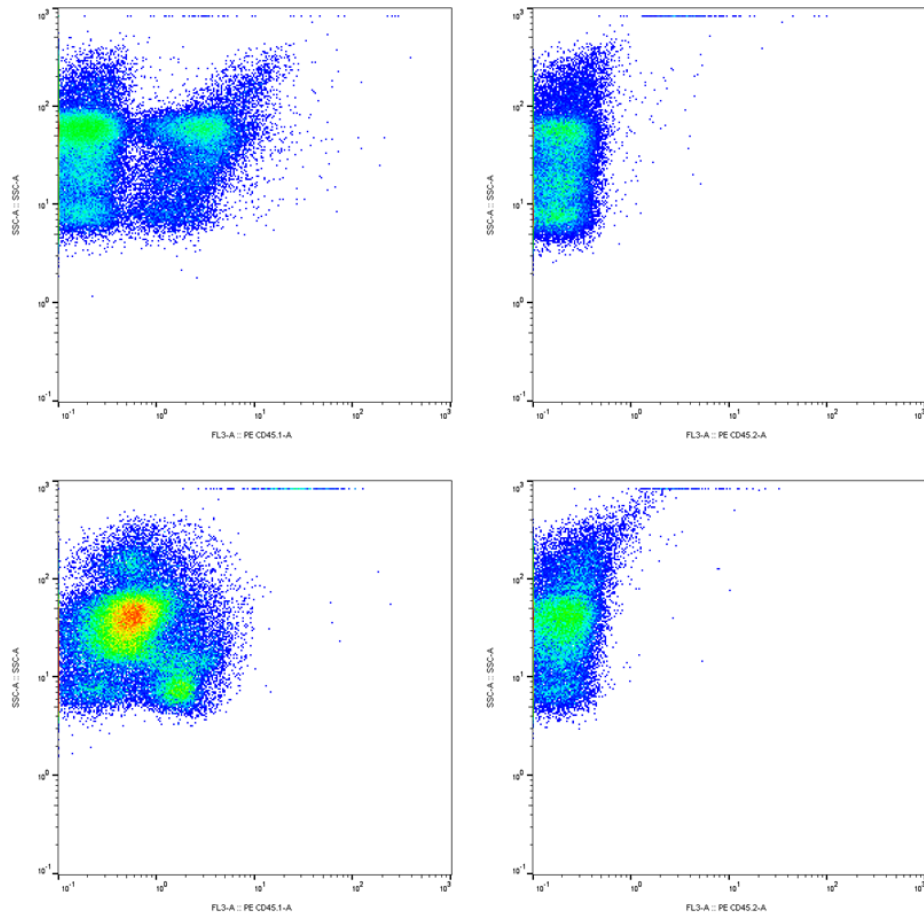


Abbildung 9: Exemplarisches FlowJo gating des Knochenmarks für CD45⁺ Zellen der PMA-, DSS- und Kontroll-Gruppe

Dargestellt sind die FlowJo gating der CD45⁺ Zellen im Knochenmark für die PMA-Gruppe (obere beiden Graphen) und die DSS-Gruppe (untere beiden Graphen) in Bezug auf die Gesamtzellzahl. Es sind jeweils die Daten einer Maus ausgewertet. Auf der linken Seite zeigt das gating auf der X-Achse die CD45.1⁺ Zellen, auf der Y-Achse ist die SSC (side Scatter) aufgetragen. Der SSC bezeichnet im FACS das Seitwärtsstreuung, welches von der Granularität und dem Zellkern beeinflusst wird. Auf der rechten Seite sind die CD45.2⁺ Zellen aufgetragen, die, wie die Graphen darstellen, kaum detektierbar sind.

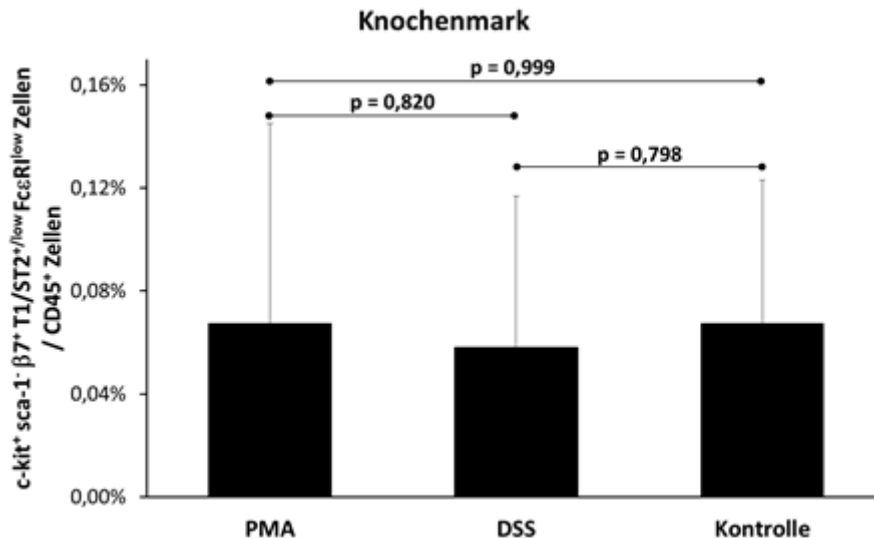


Abbildung 10: Vergleichende FACS-Analyse der CD45⁺ c-kit⁺ sca-1⁻ β7⁺ T1/ST2^{+/low} FcεRI^{low} Zellen des Knochenmarks

Im Graphen dargestellt sind für die drei Versuchsgruppen im Vergleich die c-kit⁺ sca-1⁻ β7⁺ T1/ST2^{+/low} FcεRI^{low} Zellen des Knochenmarks, die sich prozentual auf die jeweiligen CD45.1⁺ Zellen beziehen. In Zusammenschau mit der Standardabweichung lässt sich statistisch kein signifikanter Unterschied darstellen. Dargestellt sind ausschließlich in schwarz die CD45.1⁺ Zellen.

In Abbildung 11 wird die Verteilung der c-kit⁺ FcεRI⁺ Zellen in den drei Gruppen im Vergleich dargestellt. Hier zeigt sich, dass im Blut der DSS-Mäuse mit 0,8 % (CD45.1⁺) bzw. 0,3 % (CD45.2⁺) im Vergleich zu der mit PMA behandelten Mäuse mehr als doppelt so viele Zellen im Blut zu finden sind. In der Kontrollgruppe zeigt sich wie zu erwarten der weitaus geringste prozentuale Anteil an Zellen insgesamt. Statistisch zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der PMA-Gruppe und der Kontrollgruppe von $p = 0,038$; auf Grund der Fehlerabweichung stellt sich kein statistischer Unterschied zwischen DSS-Gruppe und der Kontrollgruppe dar und ebenso wenig zwischen der PMA-Gruppe und der DSS-Gruppe.

Im Blut müssten vor allem in den beiden behandelten Mausgruppen auch die Vorläuferzellen nachweisbar sein. Vergleicht man den Anteil an c-kit⁺ sca-1⁻ β7⁺ T1/ST2^{+/low} FcεRI^{low} Zellen, bezogen auf CD45.1⁺ Zellen, zeigt sich für die drei Versuchsgruppen, dass sich im Blut geringe Anteile für die PMA-Gruppe (0,05 %) und die Kontrollgruppe (0,09 %) nachweisen lassen. Für die DSS-Gruppe lassen sich im Blut c-kit⁺ sca-1⁻ β7^{low} Zellen nachweisen, diese sind T1/ST2⁻ und FcεRI^{low}. Die FlowJo-Darstellung eines ausgewählten einzelnen gatings einer Maus für die DSS-Gruppe in Abbildung 12 zeigt

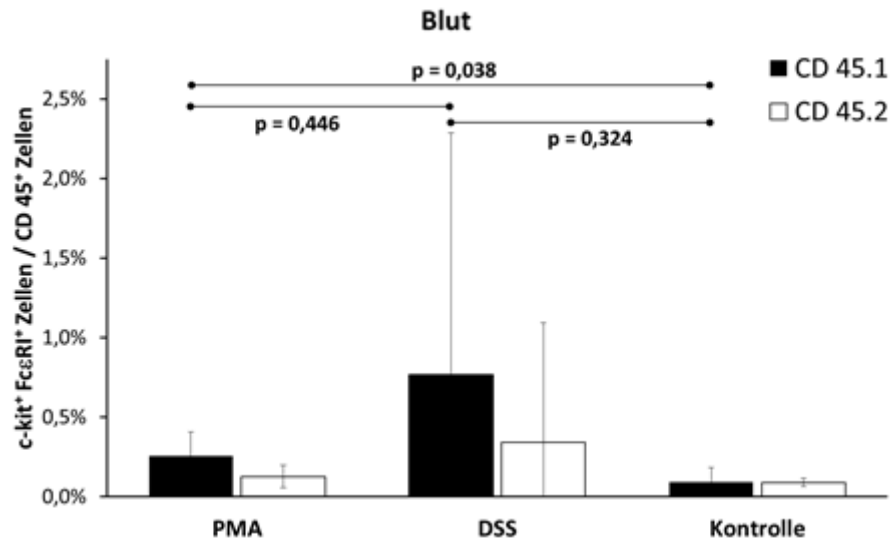


Abbildung 11: Vergleichende FACS-Analyse der CD 45⁺ c-kit⁺ FcεRI⁺ Zellen im Blut

Dargestellt sind die c-kit⁺ FcεRI⁺ Zellen bezogen auf die CD45.1⁺ bzw. CD45.2⁺ Zellen der drei Versuchsgruppen (PMA-, DSS- und unbehandelte Kontrollgruppe) im Blut. In schwarz die CD45.1⁺ und in weiß die CD45.2⁺ Zellen. Die Verteilung der CD45⁺ Zellen ist annähernd gleich. Im Vergleich zu der PMA- und der Kontrollgruppe sind in der DSS-Gruppe 0,8 % (CD45.1⁺) bzw. 0,3 % (CD45.2⁺) Zellen zu finden.

exemplarisch, dass die detektierbaren Zellen im Blut einer DSS-Maus CD45.1⁺ c-kit⁺ β7^{low} sca-1⁻ T1/ST2⁻ FcεRI^{low} sind.

Vergleicht man im Blut die prozentualen Anteile der c-kit⁺ FcεRI⁺ Zellen zu den Vorläuferzellen, dann zeigt sich, dass ein geringer Anteil c-kit⁺ β7^{low} sca-1⁻ T1/ST2⁻ FcεRI^{low} Vorläuferzellen im Blut für PMA-Gruppe (0,05 %) und für Kontrollgruppe (0,09 %) bei einer Standardabweichung von 0,1 % für die CD45.1⁺ Zellen nachweisbar ist. Wie oben bereits erläutert und in Abbildung 12 wie auch in Abbildung 13 gezeigt, lassen sich für die DSS-Gruppe im Blut 0,12 % der c-kit⁺ β7^{low} sca-1⁻ T1/ST2⁻ FcεRI^{low} Vorläuferzellen mit einer Standardabweichung von 0,1 % nachweisen. Statistisch lässt sich zwischen den drei Gruppen und auch im Vergleich der behandelten Gruppen zur Kontrolle kein signifikanter Unterschied nachweisen (vgl. Abb. 13).

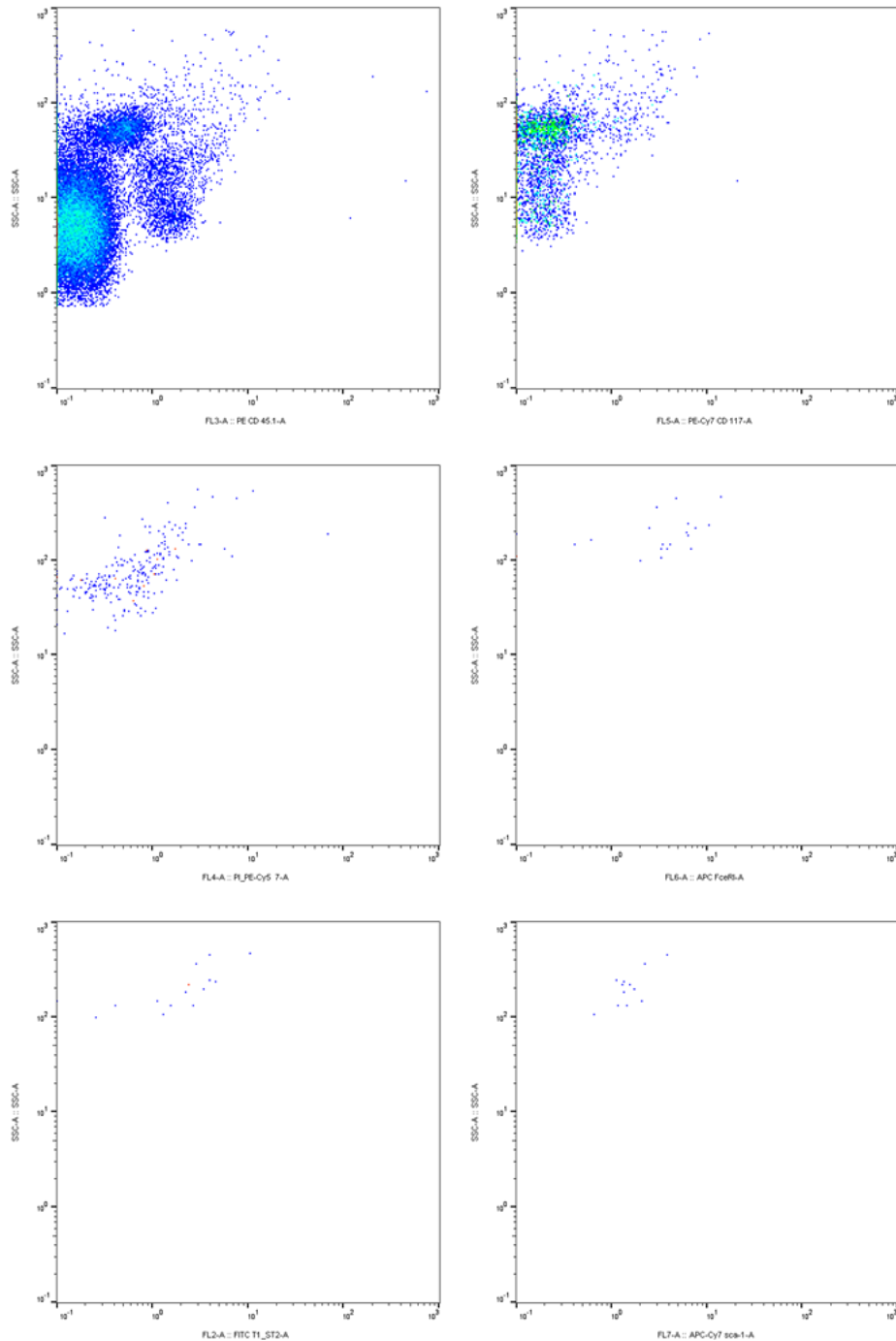


Abbildung 12: Exemplarisches FlowJo gating des Bluts einer mit DSS behandelten Maus

Die FlowJo Graphen einer Maus der DSS-Gruppe; gemessen wurden Zellen aus dem Blut. Dargestellt sind die einzelnen gatings (von links beginnend) für CD45.1, c-kit (CD117), $\beta 7$ (Cy5), Fc ϵ RI, T1ST2 und Sca-1. Der Nachweis dieser Vorläuferzellen im Blut im Hinblick auf die Gesamtzellzahlen im Blut ist erwartungsgemäß sehr gering (vgl. Abbildung 13)

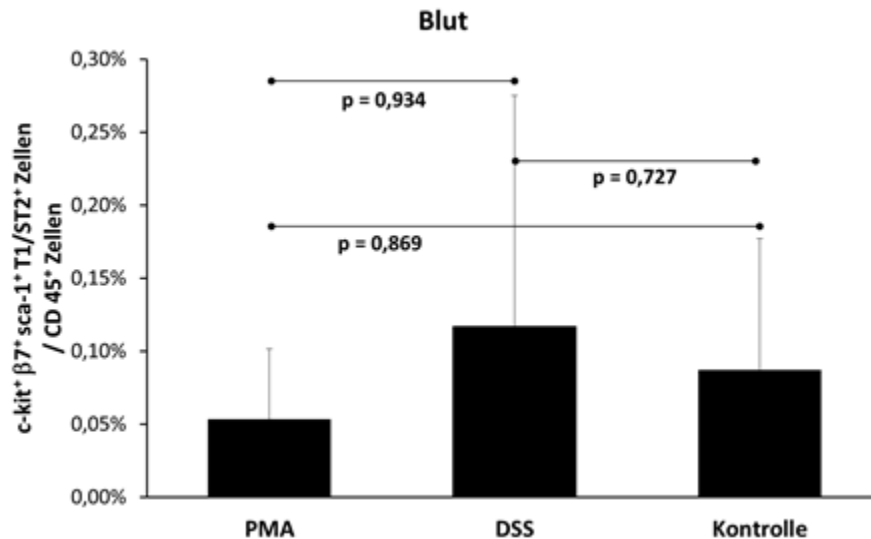


Abbildung 13: Vergleichende FACS Analyse der CD45⁺ c-kit⁺ β7⁺ sca-1⁺ T1/ST2⁺ FcεRI^{+/low} Zellen im Blut

Im Graphen dargestellt sind für die PMA-Gruppe und die Kontrollgruppe die c-kit⁺ β7⁺ sca-1⁺ T1/ST2⁺ FcεRI^{+/low} Zellen im Blut. Im Vergleich dazu wurde die c-kit⁺ β7^{low} sca-1⁺ T1/ST2⁺ FcεRI^{low} Zellen der DSS-Gruppe aufgetragen. Die gesamte Darstellung bezieht sich auf die CD45.1⁺ Zellen. Die Standardabweichung der drei Gruppen beträgt 0,1 %.

Wie in der Einleitung beschrieben, wird in der Literatur diskutiert, ob die Milz ein entscheidendes Organ für die Entwicklung der Vorläuferzellen der Mastzelle darstellt. Die histologischen und FACS-Ergebnisse wurden bislang in der Haut, dem Knochenmark und im Blut aufgezeigt. Im weiteren Verlauf werden die Ergebnisse für die Milz dargestellt. Die histologische Darstellung mittels Giemsa-Färbung erbrachte trotz verschiedener Färbeprotokolle kein darstellbares Ergebnis.

In der FACS-Färbung wurde zusätzlich zu den beiden bislang gezeigten Standardfärbungen eine dritte Färbung gewählt, die im Vergleich zu den Vorläuferzellen die CD8a⁺ und CD4⁺ Zellen zeigt. Der Oberflächenmarker CD4 wird im FACS angewandt, um T-Helferzellen zu zeigen. Der Oberflächenmarker CD8a ist charakterisierend für cytotoxische T-Zellen. Die Mastzellen und ihre Vorläuferzellen gehören zu den Immunzellen, wie auch die T-Zellen. In Abbildung 14 ist das Verhältnis der CD4⁺ und CD8a⁺ Zellen in allen drei Versuchsgruppen im Vergleich CD45.1⁺ vs. CD45.2⁺ dargestellt. Es kann gezeigt werden, dass mehr CD4⁺ als CD8a⁺ Zellen in allen drei Versuchsgruppen nachgewiesen werden können. Vergleicht man die Verteilung der CD4⁺ und CD8a⁺ Zellen

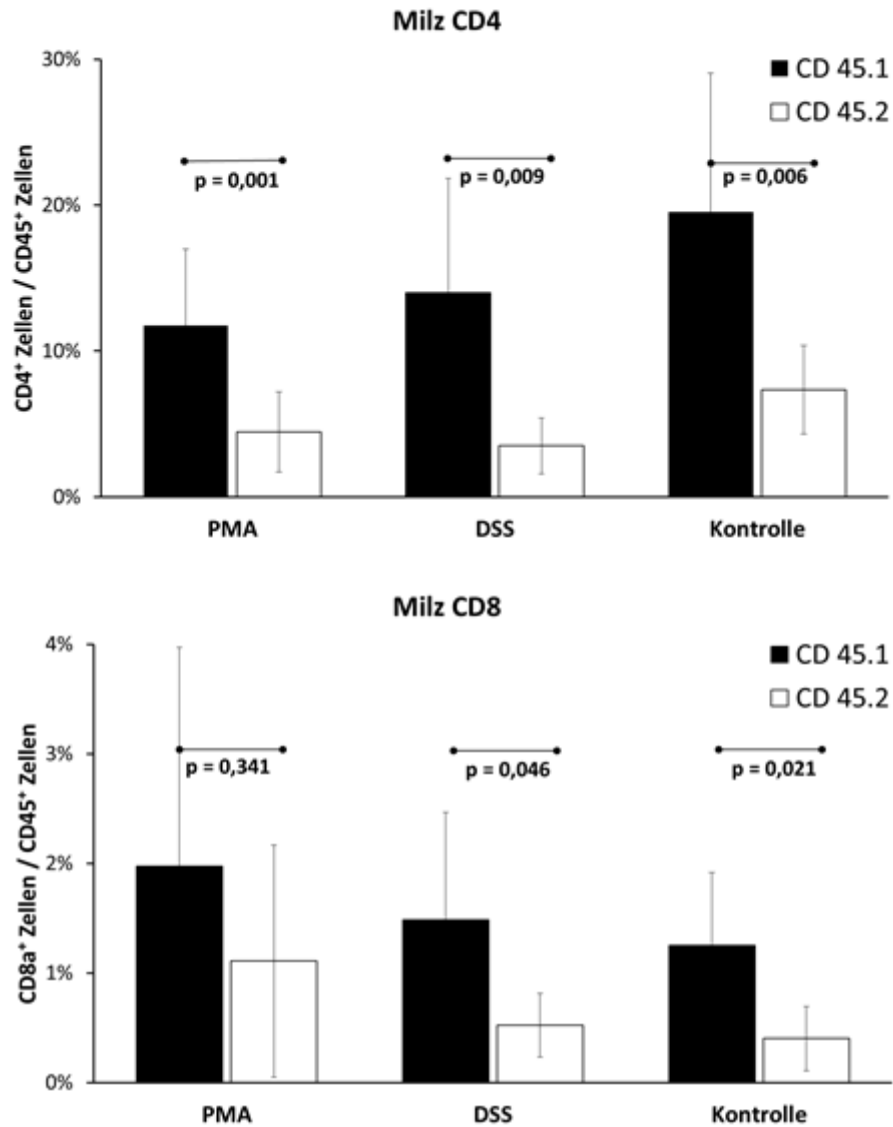


Abbildung 14: Vergleichende FACS-Analyse der Milz – CD8a⁺ und CD4⁺

In den beiden Graphen sind die CD8a⁺ und CD4⁺ Zellen der drei Gruppen im Organ Milz im Vergleich dargestellt. In schwarz sind die CD45.1⁺ und in weiß die CD45.2⁺ Zellen dargestellt. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtzellzahl. Es lassen sich mehr CD45.1⁺ Zellen sowohl in der CD8a als auch in der CD4 Färbung nachweisen. Im Vergleich lassen sich mehr CD4⁺ Zellen als CD8a⁺ Zellen in der Milz darstellen.

innerhalb der Gruppen, sind in der Kontrollgruppe mehr CD4⁺ Zellen darstellbar als in den beiden behandelten Gruppen. In der PMA-Gruppe sind mehr CD8a⁺ Zellen darstellbar als in der DSS- oder der Kontrollgruppe.

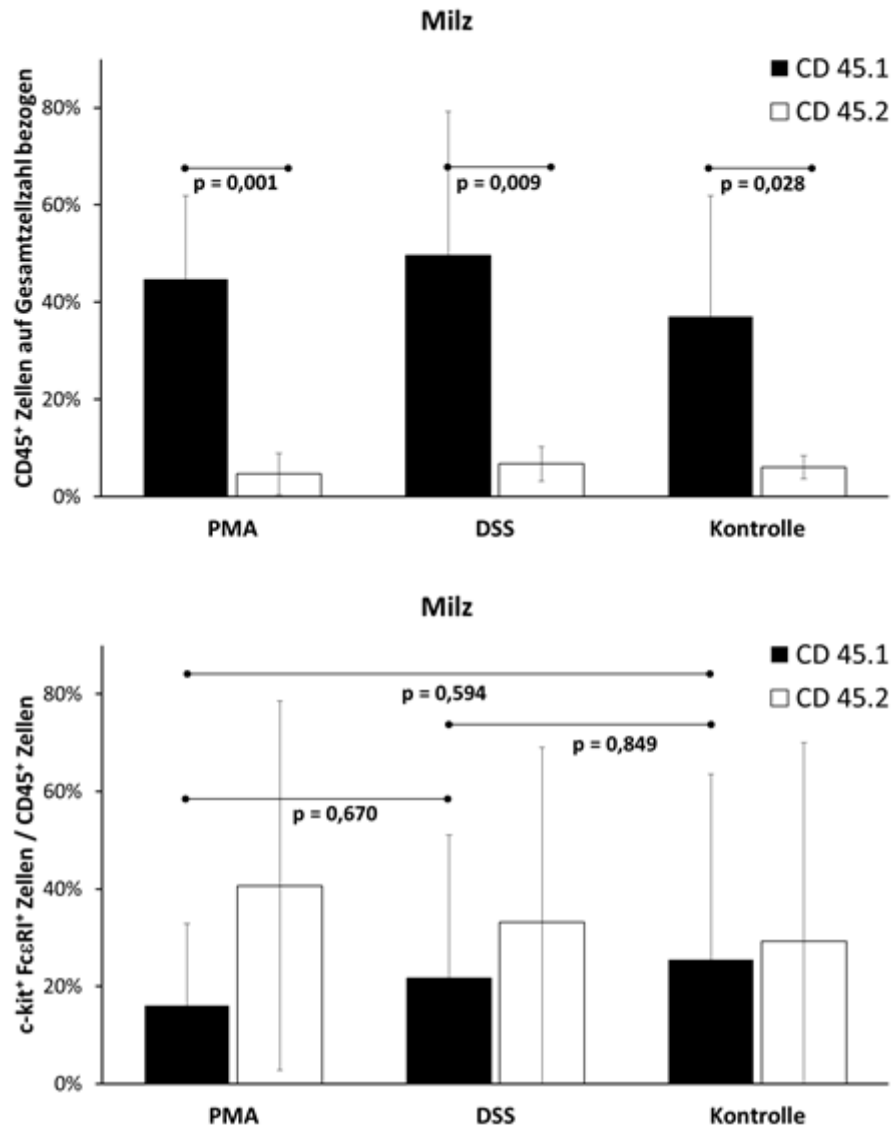


Abbildung 15: Vergleichende FACS-Analyse der Milz – CD45.1⁺ vs. CD45.2⁺ und CD45⁺ c-kit⁺ FcεRI⁺

Im oberen Graphen dargestellt sind für die drei Versuchsgruppen die Auswertungen der CD45.1⁺ vs. CD45.2⁺ Zellen in der Milz auf die Gesamtzellzahl bezogen. Im unteren Graphen sind die c-kit⁺ FcεRI⁺ Zellen auf die CD45.1⁺ bzw. CD45.2⁺ Zellen bezogen. In schwarz dargestellt die CD45.1⁺ Zellen, in weiß die CD45.2⁺ Zellen. Gezeigt werden kann, dass der Anteil der c-kit⁺ FcεRI⁺ Zellen in der Gruppe der CD45.2⁺ Zellen fast doppelt so hoch ist wie in der CD45.1⁺ Gruppe, obwohl in der Darstellung auf die Gesamtzellzahl, wie zu erwarten, der Nachweis von CD45.2⁺ Zellen unter 10 % liegt.

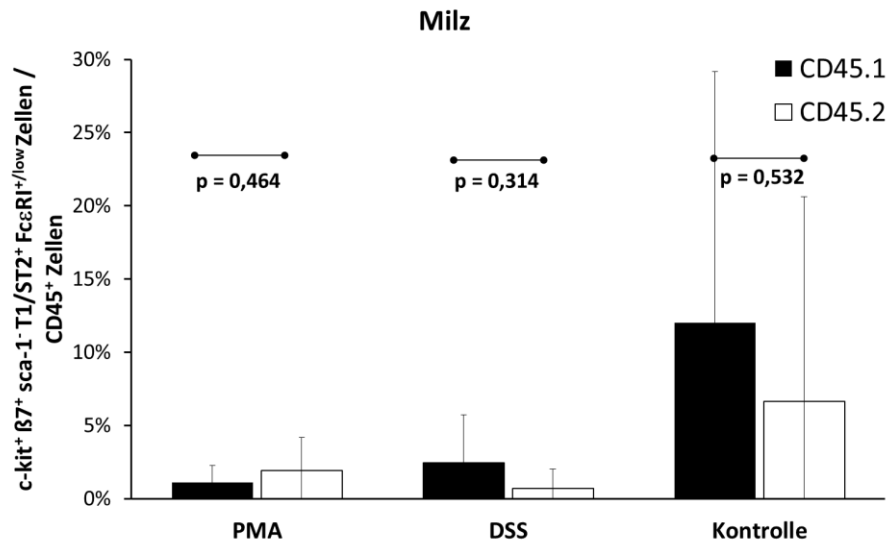


Abbildung 16: Vergleichende FACS-Analyse der CD45⁺ c-kit⁺ β7⁺ sca-1⁻ T1/ST2⁺ FcεRI^{+/low} Zellen der Milz

Im Graphen sind die Vorläuferzellen c-kit⁺ β7⁺ sca-1⁻ T1/ST2⁺ FcεRI^{+/low} Zellen in der Milz bezogen auf CD45.1⁺ bzw. CD45.2⁺ dargestellt. In den beiden Gruppen, die einem Mastzellspezifischen Reiz ausgesetzt waren, stellen sich weniger Vorläuferzellen in der Milz, als in der unbehandelten Kontrollgruppe dar.

Stellt man das Verteilungsmuster der CD45.1⁺ vs. CD45.2⁺ Zellen in der Milz dar, lassen sich eindeutig mehr CD45.1⁺ Zellen darstellen für die CD4⁺ und CD8a⁺ Zellen (vgl. Abb. 14), sowie auch für die bisher gezeigte Standardfärbung der c-kit⁺ FcεRI⁺ Zellen (vgl. Abb. 15). Dies zeigt auch die statistische Auswertung. Ausnahme ist die Verteilung der CD8a⁺ Zellen in der PMA-Gruppe, die unter Berücksichtigung der Fehlerabweichung mit $p = 0,341$ keinen statistisch signifikanten Unterschied aufzeigt.

Stellt man nun wiederum aus der Standardfärbung im ersten gating vorselektierten CD45.1⁺ bzw. CD45.2⁺ Zellgruppe die c-kit⁺ FcεRI⁺ Zellen dar, zeigt sich, dass sich für die Milz in der nicht transplantierten CD45.2⁺ Zellgruppe anteilig mehr c-kit⁺ FcεRI⁺ Zellen nachweisen lassen, als bei den transplantierten CD45.1⁺ Zellen (vgl. Abb. 15).

In der statistischen Auswertung der Gruppen untereinander und der behandelten gegenüber der unbehandelten Gruppe lassen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede darstellen.

In der FACS-Auswertung der Vorläuferzellen in der Milz zeigt sich in Abbildung 16, dass in der unbehandelten Kontrollgruppe deutlich mehr Vorläuferzellen darstellbar sind, als in den beiden behandelten Mausgruppen.

Der zweite Reiz zur Provokation einer Immunantwort der Mastzellen war die Gabe von

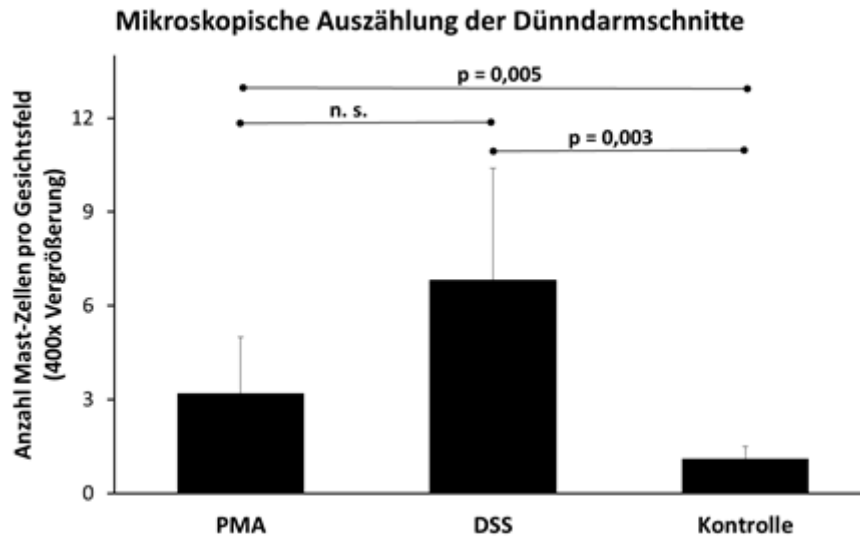


Abbildung 17: Mikroskopische Auszählung der Giemsa-Färbung der Dünndarmschnitte der PMA-, DSS- und Kontroll-Gruppe

In der mikroskopischen Auszählung der Giemsa-Färbung des Dünndarms zeigt sich zur Kontrollgruppe ein Anstieg der Mastzellen in den Dünndarmschnitten der DSS-Gruppe und auch ein kleiner Anstieg der Zellen in der PMA-Gruppe.

DSS in das Trinkwasser der Mäuse. In den histologischen Schnitten zeigte sich schon rein optisch die Darmschleimhaut der DSS-Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen verdickt.

Bei der mikroskopischen Auswertung (siehe Abb. 17) zeigt sich, dass es im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe zu dem erwarteten Anstieg der Mastzellen im Dünndarm der DSS behandelten Mäuse kommt. Es lässt sich im Vergleich mit den unbehandelten Mäusen ein Anstieg der adulten Mastzellen im Darm der PMA behandelten Mäuse darstellen. In der statistischen Auswertung lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Gruppen (DSS-Gruppe und PMA-Gruppe) zu der unbehandelten Kontrollgruppe darstellen.

In der FACS-Darstellung lässt sich in der ersten Auswertung wiederum zeigen, dass auch hier mehr CD45.1⁺ als CD45.2⁺ Zellen in der peritonealen Lavage nachweisbar sind. Dies bestätigt die statistische Auswertung. Die c-kit⁺ FcεRI⁺ Zellen sind anteilig in den nicht transplantierten CD45.2⁺ Zellen deutlich mehr in der peritonealen Lavage nachzuweisen als in den transplantierten CD45.1⁺ Zellen (vgl. Abb. 18).

Untersucht man nun die Vorläuferzellen, so lassen sich unter Berücksichtigung der

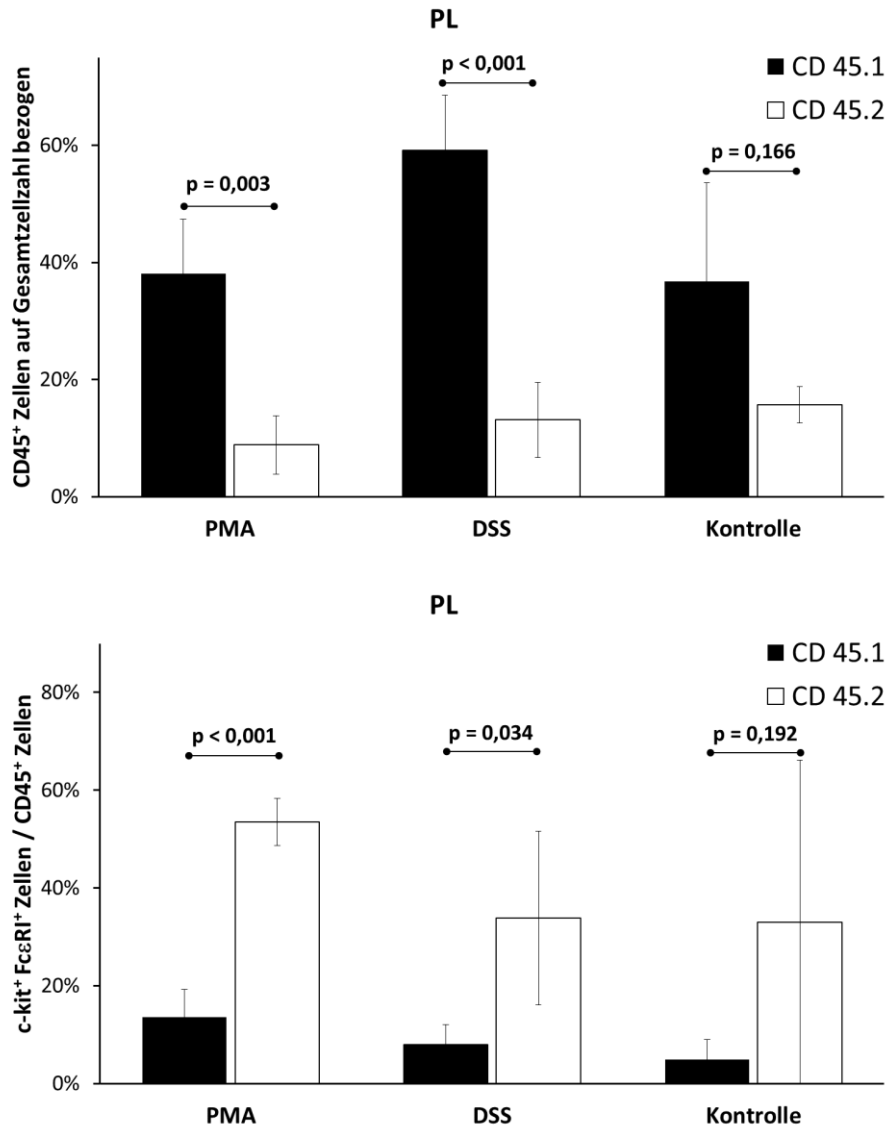


Abbildung 18: Vergleichende FACS-Analyse der peritonealen Lavage (PL) – CD45.1⁺ vs. CD45.2⁺ und der CD45⁺ c-kit⁺ FcεRI⁺ Zellen

In den Graphen dargestellt ist oben der Vergleich CD45.1⁺ vs. CD45.2⁺ bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen in der peritonealen Lavage (PL). Es zeigt sich eindeutig, dass die Transplantation erfolgreich war. Der untere Graph zeigt die c-kit⁺ FcεRI⁺ Zellen in Bezug auf die CD45⁺ Zellen. Es zeigt sich, dass prozentual mehr CD45.2⁺ FcεRI⁺ c-Kit⁺ Zellen nachweisbar sind. Unter Berücksichtigung der Fehlerabweichung zeigt sich hier ein signifikanter Unterschied zwischen den CD45.2⁺ FcεRI⁺ c-Kit⁺ Zellen der PMA-Gruppe und den Zellen der DSS-Gruppe wie auch der Kontrollgruppe.

Fehlerabweichung unter den drei Versuchsgruppen keine eindeutigen Unterschiede darstellen. Wie auch in der Darstellung der FcεRI⁺ c-Kit⁺ Zellen der PL zeigt sich auch bei den der CD45⁺ c-kit⁺ β7⁺ sca⁻¹ T1/ST2⁺ FcεRI^{+/low} Zellen ein eindeutig höherer Anteil an CD45.2⁺ Zellen (siehe Abb. 19).

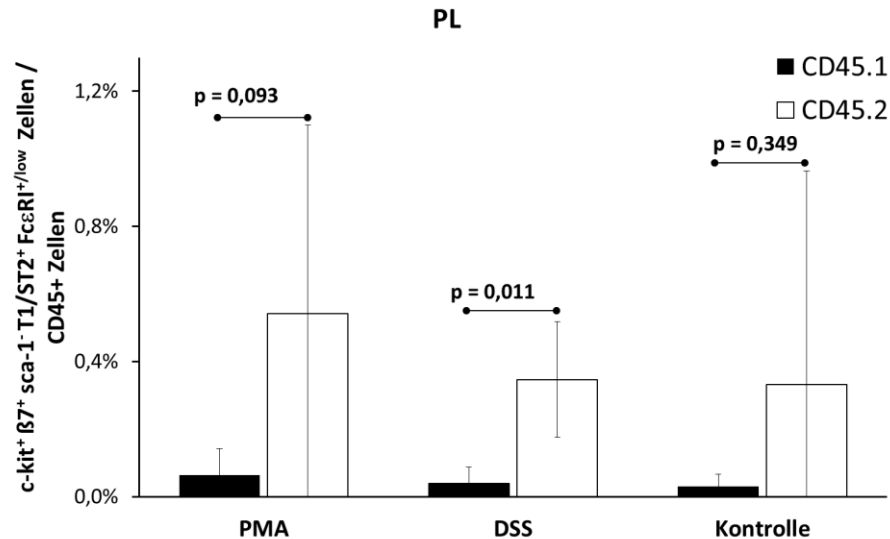


Abbildung 19: Vergleichende FACS-Analyse der CD45⁺ c-kit⁺ β7⁺ sca-1⁻ T1/ST2⁺ FcεRI^{+/low} Zellen in der PL

Dargestellt sind die Vorläuferzellen c-kit⁺ β7⁺ sca-1⁻ T1/ST2⁺ FcεRI^{+/low} Zellen in der peritonealen Lavage. In schwarz sind die CD45.1⁺ Zellen und in weiß die CD45.2⁺ Zellen dargestellt. Die Auswertung bezieht sich auf die jeweiligen CD45.1⁺ bzw. CD45.2⁺ Zellen. Der prozentuale Anteil der Vorläuferzellen in den drei verschiedenen Versuchsgruppen weist unter Berücksichtigung der Fehlerabweichung keinen signifikanten Unterschied auf. Es stellt sich ein ähnlicher Effekt wie in Abbildung 18 dar; der Anteil der CD45.2⁺ Zellen ist eindeutig höher.

Dieser Unterschied zwischen den CD45.1⁺ zu CD45.2⁺ Zellen lässt sich für die PMA- und DSS-Gruppe statistisch zeigen. Unter Berücksichtigung der Fehlerabweichung lässt er sich nicht für die Kontrollgruppe darstellen.

Zwischen den behandelten Gruppen und der unbehandelten Kontrollgruppe konnte kein statistisch relevanter Unterschied aufgezeigt werden.

4 Diskussion

Es ist unumstritten, dass die Mastzelle aus dem Knochenmark stammt und eine eigenständige Zelllinie besitzen muss. Demgegenüber ist Grundlage vieler wissenschaftlicher Diskussionen, ob es innerhalb dieser Zelllinie Entwicklungsschritte gibt, die sich die Mastzelle mit den Granulozyten teilt. Verschiedene Oberflächenmarker sind bekannt, mit Hilfe derer sich Mastzellen unterschiedlicher Entwicklungsstufen darstellen lassen. Dabei wurden Vorläuferzellen isoliert und *in vitro* kultiviert, um zu zeigen, aus welchen Vorläuferzellen sich nur Mastzellen entwickeln und aus welchen sich sowohl Mastzellen als auch Basophile Granulozyten entwickeln können [10].

Ziel dieser Arbeit war zum einen eine Methode zu entwickeln, die die bisherigen Ergebnisse aus der Literatur zusammenführt, und zum anderen diese Methode in einem *in vivo* Experiment unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen anzuwenden. Die vorliegende Arbeit fasst die relevanten Oberflächenmarker in einer Färbemethode zusammen. Es wurde *in vivo*, ohne einen Zwischenschritt *in vitro*, unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen das Verteilungsmuster der Mastzelle und ihrer Vorläuferzellen dargestellt.

Um bestimmte Zellen im Körper zu identifizieren und wiederfinden zu können, wurde als grundlegende Methode das Erzeugen einer Chimäre gewählt. Wie beschrieben wurde einer CD45.2⁺ Maus nach Bestrahlung und daraus resultierender Zerstörung des Knochenmarks die Knochenmarkszellen einer CD45.1⁺ Maus transplantiert. Vor allem in der Knochenmark- und Blutanalyse sollten nach erfolgreicher Bestrahlung und Rekonstitution keine oder nur ein geringer Anteil an CD45.2⁺ Zellen nachweisbar sein. Wie im Ergebnisteil dargestellt, sind im Knochenmark aller drei Versuchsgruppen unter 0,1 % CD45.2⁺ Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl zu finden. Auch im Blut der drei Versuchsgruppen (PMA-, DSS- und Kontrollgruppe) lassen sich nur geringe Anteile an CD45.2⁺ Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl detektieren. Dies zeigt klar, dass die Transplantation an sich erfolgreich war.

In den Organen Milz, Haut und peritoneale Lavage lassen sich jedoch in allen drei Versuchsgruppen CD45.2⁺ Zellen darstellen. Wie in der Einleitung diskutiert, sind die verschiedenen Gewebe unterschiedlich strahlensensibel. Das Knochenmark und die Zellen der Mukosa gelten als sehr strahlensensibel. Im Knochenmark und in der Blutbahn lassen sich am wenigsten CD45.2⁺ Zellen darstellen. In der Haut und in der Peritonealen Lavage

sind annähernd 10 % der Zellen CD45.2⁺. Somit ist die mögliche Erklärung der unterschiedlichen Strahlensensibilität nicht ausreichend, um zu erklären, dass im Knochenmark und in der peritonealen Lavage mal annähernd keine (Knochenmark) und mal 10 % der Zellen CD45.2⁺ (PL) sind. In der Literatur wurde von der Arbeitsgruppe Kitamura 1983 eine Varianz in der Strahlensensibilität der Precursorzelle der Mastzelle beschrieben. In einzelnen Experimenten wurde gezeigt, dass Precursorzellen im Knochenmark strahlensensibler sind als die in der Haut auf [71]. Ob diese dargestellten Ergebnisse auch auf die vorliegende Arbeit zutreffen könnten, müsste in weiteren Experimenten geklärt werden.

In den Organen Haut, Milz und peritoneale Lavage lässt sich innerhalb der CD45.2⁺ Zellen ein hoher Anteil sowohl FcεRI⁺ c-kit⁺ Zellen sowie vor allem der c-kit⁺ sca-1⁻ β7⁺ T1/ST2⁺ FcεRI^{+/low} Vorläuferzellen nachweisen. Am stärksten ist dieses Phänomen in der Haut und der peritonealen Lavage zu beobachten, aber auch in der Milz ist es darstellbar. Es ist zu diskutieren, ob dieses Ergebnis der Art der Knochenmarktransplantation geschuldet sein kann.

Die Knochenmarktransplantation ist ein etabliertes Modell um funktionelle Versuche mit hämatopoetischen Zellen *in vivo* durchführen zu können. Dabei ist die etablierte Methode die intravenöse Injektion in die Schwanzvene der Maus oder retrobulbär in den Venenplexus der narkotisierten Maus. Wie beschrieben erfolgte die Transplantation der CD45.1⁺ Zellen mittels Injektion der gewonnenen Knochenmarkzellen in die Schwanzvene der Maus. Die intravenös injizierten CD45.1⁺ Knochenmarkzellen würden durch die Blutbahn auch die Milz passieren. Dass in der Milz vermehrt CD45.1⁺ Zellen nachweisbar sind, könnte mit dieser Methode der Transplantation zusammenhängen. Es erklärt allerdings nicht, warum der prozentuale Anteil an FcεRI⁺ c-kit⁺ Zellen sowie der c-kit⁺ sca-1⁻ β7⁺ T1/ST2⁺ FcεRI^{+/low} Zellen innerhalb der CD45.2⁺ Zellen in der Milz so hoch ist.

Weiterhin erklärt die Art der Transplantation nicht hinreichend die Ergebnisse in der Haut und in der peritonealen Lavage. Um klar zu zeigen, dass dieses Ergebnis an sich die belegt, dass Stammzellen, die in der Lage sind, sich in Mastzellen zu differenzieren, in der Haut und im Magen-Darm-Trakt unabhängig vom Knochenmark existieren und die Bestrahlung in der Ruhephase überlebt haben, sind weitere Experimente in dieser Richtung notwendig.

Die Frage, ob die Darstellung dieser Unterschiede ein Fehler in der Methode oder Auswertung aufzeigt, kann verneint werden. Auch in Zusammenschau der Fehlerabweichung

lassen sich die hier gezeigten Unterschiede in der Verteilung der CD45.2⁺ Zellen und der Darstellung der prozentualen hohen Anteile an Vorläuferzellen in dieser Zellpopulation eindeutig nachweisen. Wie beschrieben wurde der Versuchsaufbau und dessen Auswertung mittels FACS-Analyse und Fluoreszenzfärbung zweimal mit gleichem Ergebnis durchgeführt, und damit die Reproduzierbarkeit belegt. Damit kann die Hypothese, dass es ruhende Stammzellen gibt, die sich in Mastzellen differenzieren können, durch die hier dargestellte Methode Grundlage weitere Experimente sein, um abschließende Beweise darstellen zu können.

Inwiefern die Art der Transplantation erklären kann, warum bezogen auf die Gesamtzahl zwar mehr CD45.1⁺ Zellen darstellbar sind, aber in der Auswertung der spezifischen Charakterisierung der Mastzelle der prozentuale Anteil der CD45.2⁺ Zelle bezogen auf die vorher ausgewählte CD45⁺ Zellen höher ist, ist wie oben erwähnt kritisch. Vor allem in den beiden Zielorganen Haut und peritoneale Lavage ist dieser Unterschied deutlich darstellbar. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den beiden Organen Knochenmark und Blut, in denen kaum CD45.2⁺ Zellen nachweisbar sind und somit eine erfolgreiche Transplantation bewiesen werden kann, fordert dieses Ergebnis weitere Untersuchungen, um die Verteilung und Herkunft dieser Zellen weiter zu untersuchen. Dabei könnte in weiteren Versuchen zum einen die Strahlendosis erneut kritisch betrachtet werden sowie die Reinheit der transplantierten Zellen. In verschiedenen Arbeiten aus der Veterinärmedizin bezüglich Transplantationsmodell der Maus konnte gezeigt werden, dass es zu signifikanten Unterschieden zum einen zwischen den verschiedenen Transplantationsmöglichkeiten wie auch der Reinheit der transplantierten Zellen. Auch scheint das Alter der Tiere eine entscheidende Rolle zu spielen [72]. Dies könnte in einem vergleichenden Folgeversuch evaluiert werden.

In der Haut ist der Anteil der FcεRI⁺ c-kit⁺ Zellen in der PMA-Gruppe wie erwartet höher als in der Kontrollgruppe und der DSS-Gruppe. Demgegenüber ist kein Unterschied zwischen den Gruppen bzgl. der c-kit⁺ sca-1⁻ β7⁺ T1/ST2⁺ FcεRI^{+/low} Vorläuferzellen darstellbar. Es kann diskutiert werden, ob das im Trinkwasser verabreichte Reagenz DSS durch die Fellpflege der Maus auf die Haut aufgetragen wurde und dort eine Mastzellantwort provoziert hat. Dieser Ansatz kann auch die Ergebnisse der Giemsa-Färbung erklären, in denen eine erhöhte Mastzellanzahl in der Haut der DSS-Gruppe dargestellt werden konnte. Vor allem in Hinblick auf die Verteilung innerhalb der CD45.1⁺ zu CD45.2⁺ Zellen kann jedoch auch ein Erklärungsansatz sein, dass Vorläuferzellen auch aus anderen

Organsystemen außer dem Knochenmark rekrutiert werden können. Hierfür finden sich Hinweise in der Literatur. In einer Arbeit von Kumamoto et al. konnte 2003 gezeigt werden, dass der Haarfollikel ein Reservoir für „mast cell precursors“ darstellt [55]. In der weiter gefassten Arbeit von Shi et al. wird 2004 berichtet, dass nicht nur im Haarfollikel der Maus hämatopoetische Stammzellen identifiziert werden können, sondern der Nachweis auch bei menschlichen Haarfollikeln gelungen ist [73]. Wenn diese Zellen während einer Bestrahlung ruhen, dann wäre die Annahme sinnvoll, dass sie in den 54 Tagen der Rekonstitution in der Lage gewesen sind, auch andere Gewebe durch CD45.2⁺ Zellen zu rekonstituieren, oder aber während einer Immunreaktion Vorläuferzellen bereitzustellen. Die Gruppe um Kitamura konnte 1985 zeigen, dass aus dem Knochenmark kultivierte adulte Mastzellen, wenn sie intravenös, intrakutan oder intraperitoneal einer Mastzelldefizienten Maus transplantiert wurden, sich sowohl zu „connective tissue type MC“ als auch zu „mucosal MC“ entwickeln konnten [56]. Auch diese Annahme kann Grundlage weiterer Forschung sein, welche an Hand der hier dargestellten Färbemethode fortgeführt werden könnte.

Im Knochenmark der Mäuse sind mit 0,1 % kaum CD45.2⁺ Zellen in der Gesamtzahl der Zellen nachweisbar. Der Anteil der FcεRI⁺ c-kit⁺ Zellen und c-kit⁺ sca-1⁻ β7⁺ T1/ST2⁺ FcεRI^{+/low} Zellen lag in allen drei Gruppen unter Berücksichtigung der Fehlerabweichung unter 0,5 %. Dieses Ergebnis war unerwartet, da als Ausgangsvermutung in der PMA-Gruppe und DSS-Gruppe als eine Reaktion auf die Immunantwort ein Anstieg der Zellen angenommen wurde. In Reflektion des Versuchsaufbaus kann die Hypothese aufgestellt werden, dass, da die Mäuse am Ende der Behandlung getötet wurden, das Knochenmark kaum noch aktiv war, weil die Zellen ihre Zielorgane schon erreicht hatten. Um dies zu klären müssten weitere Experimente folgen, bei denen an verschiedenen Tagen der Behandlung die Organe ausgewertet und die Verteilung der Zellen im Verlauf der Infektion dargestellt werden. Dabei müsste die in dieser Arbeit entwickelte Färbemethode und auch der hier dargestellte Versuchsaufbau übernommen werden, und nur die Zeitpunkte variiert werden.

In der Milz zeigt sich in Bezug auf die immunologischen Zellen CD4 und CD8a eine erwartete Verteilung. Am Paraffinschnitt der Milz konnte mit den etablierten Standardfärbeprotokollen nicht gezeigt werden, ob es zu einer erhöhten Anzahl von Mastzellen kommt, wenn die Maus einem Mastzellreiz ausgesetzt wurde. In der Literatur werden im Nagermodell formalinresistente Bindegewebsmastzellen und formalinsensitive

Mucosamastzellen unterschieden [30], so dass in einer weiterführenden Arbeit verschiedene Fixier- und Färbetechniken für die Milz angewandt werden konnten. Eine Dissertation hat am Hundemodell gezeigt, wie die Darstellbarkeit von Mastzellen je nach Fixierungsmethode variiert, und eine Auswertbarkeit unmöglich werden kann [74]. Die in dieser Arbeit etablierte FACS-Methode konnte jedoch auch in der Milz erfolgreich angewandt werden und zeigte eine suffiziente Darstellbarkeit der Zellen.

Weiterhin gilt es zu bedenken, dass die Milz am Ende der Behandlung entnommen wurde, sodass angenommen werden könnte, dass der kritische Zeitpunkt am Anfang der Behandlung, zu dem schnell viele Mastzellen benötigt wurden und somit die Milz gefordert war, hier nicht abgebildet wurde. In einem weiteren Versuch könnte man zu festgesetzten Zeitpunkten nach Gabe des ersten Reizes die Milz entnehmen und färben, um zu sehen, ob der Zeitpunkt einer Infektion die Beteiligung der Milz beeinflusst. Ungeklärt ist, warum vor allem bei der Darstellung der Vorläuferzellen der Mastzelle die unbehandelte Kontrollgruppe mehr Zellen aufweist als die beiden behandelten Gruppen (PMA- und DSS-Gruppe).

Wie in den beiden Zielorganen lässt sich auch in der Milz darstellen, dass in Bezug auf die Gesamtzellzahl mehr CD45.1⁺ Zellen darstellbar sind. Natürlich könnte wie schon anfangs erwähnt in Bezug auf die Milz dieses Ergebnis der Methode der hier angewandten Transplantation sein.

Vergleicht man die hier dargestellten Ergebnisse mit den in der Einleitung aufgezeigten Ergebnissen der Arbeitsgruppen Gurish [10,15] und Galli [20-22], ist die hier dargestellte Methode ebenfalls in der Lage die Mastzellvorläuferzelle suffizient darzustellen. Anhand des Verteilungsmusters *in vivo* kann der Weg der Mastzelle aus dem Knochenmark und die Verteilung in den Organen verfolgt und dargestellt werden. Nicht geklärt werden konnte die Frage, ob die Milz ein entscheidendes Organ in der Entwicklung der Mastzelle ist.

Betrachtet man die Ergebnisse für das zweite Zielorgan, den Magen-Darm-Trakt, dann ist in der Übersicht der CD45.1⁺ zu CD45.2⁺ Zellen die DSS-Gruppe im Vergleich mit mehr Zellen darstellbar. In der spezifischen Darstellung der FcεRI⁺ c-kit⁺ Zellen zeigen sich in der peritonealen Lavage mehr Zellen in der DSS-Gruppe als in der PMA-Gruppe und in der Kontrollgruppe. Einen Unterschied in den c-kit⁺ sca-1⁻ β7⁺ T1/ST2⁺ FcεRI^{+/low} Zellen zeigt sich nicht innerhalb der Gruppen, sondern, wie bereits am Anfang diskutiert, in der Verteilung der CD45.1⁺ zu CD45.2⁺ Zellen.

Wenn in der Haut Stammzellen vorhanden sind, die sich in Mastzellen differenzieren können, dann könnte der Nachweis dieser Zellen in der Haut einer mit DSS behandelten Maus auch ein Hinweis dafür sein, dass das Organ Haut Zellen für den Magendarmtrakt zu Verfügung stellen könnte. In der Blutbahn der DSS Mäuse sind zwar im Vergleich zu PMA und der Kontrollgruppe mehr Vorläuferzellen nachweisbar, jedoch sind diese Zellen c-kit⁺ sca-1⁻ $\beta 7^{\text{low}}$ T1/ST2⁻ Fc ϵ RI^{low}. Es wäre jedoch vor allem für den Oberflächenmarker $\beta 7$ zu erwarten gewesen, dass dieser besonders stark ausgeprägt ist, da, wie in der Einleitung beschrieben, dieser essentiell für das „homing“ und das „recruitment“ der Zellen ist. In Arbeiten von Gurish, Arinobu und Collington ist $\beta 7$ der entscheidende Oberflächenmarker für die Migration der Mastzelle in das Zielgewebe [10], [25,40]. Es ist unerwartet, dass gerade für die DSS-Gruppe dieser Marker im Organ Blut heruntergeregelt ist, während er in den anderen Organen nachweisbar ist.

In den histologischen Färbungen und auch in den FACS-Darstellungen lässt sich zeigen, dass bei beiden Reizen das nicht mitbehandelte Organ ebenfalls mit einer Proliferation von Vorläuferzellen reagiert. Wäre dies auch in den FACS-Darstellungen des Knochenmarks aufgetreten, könnte man von einem Messfehler ausgehen. Wie schon oben diskutiert, könnte man bezüglich der histologischen Darstellung weitere Experimente anschließen, die die Formalinsensitivität der verschiedenen Gewebsmastzellen vergleichend untersucht. Da das Phänomen jedoch nicht allein in der histologischen Giemsa-Färbung aufgetreten ist, sondern auch in der FACS-Darstellung, kann insgesamt, so auch hier, von der Idee eines schwerwiegenden Systematikfehlers Abstand genommen werden.

Betrachtet man die statistische Auswertung der dargestellten Messwerte, zeigten sich in der Statistik kaum signifikante Ergebnisse für diese Arbeit, vor allem im Vergleich der Ergebnisse miteinander. Mit einer Gruppengröße von vier bzw. drei Mäusen pro Versuchsgruppe kann auch unter Zusammenführung der beiden Messungen keine relevante Versuchstieranzahl erreicht werden. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung verweisen nicht auf einen Grundlagenfehler dieser Arbeit und ebenso wenig auf allgemeine Fehler. Das Ziel dieser Arbeit zum einen, eine Färbemethode als Grundlage für weitere Experimente zu etablieren, um zu bestätigen, dass die Mastzelle aus dem Knochenmark stammt, und zum anderen, ein Verteilungsmuster der Mastzelle und ihrer Vorläuferzellen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen darzustellen, ist erreicht worden.

Im Vergleich zwischen physiologischer und pathophysiologischer Verteilung der Zellen

zeigt sich zum einen ein unerwartet hoher Nachweis von CD45.1⁺ und CD45.2⁺ Zellen in der Kontrollgruppe für das Organ Milz und zum anderen zeigt sich in der peritonealen Lavage ein hoher Anteil von CD45.2⁺ Zellen auf ähnlichem Niveau wie in den beiden behandelten Gruppen. Betrachtet man die Graphen, die die CD 45.1⁺/2⁺ Verteilung auf die Gesamtzellzahl darstellt, zeigt sich deutlich der Unterschied zwischen behandelter Gruppe und Kontrollgruppe. Werden aus den CD45⁺ Zellen die c-kit⁺ FcεRI⁺ Zellen und die Vorläuferzellen selektiert, zeigt sich, dass in der Kontrollgruppe prozentual auf die Gesamtzellzahl bezogen eine hohe Anzahl von Vorläuferzellen vor allem bei den CD45.2⁺ Zellen darstellen lässt. Die Organe Knochenmark und Blut zeigen keine solchen Auffälligkeiten. Es ist zu vermuten, dass dieses Phänomen mit der Bestrahlung und der anschließenden Transplantation zusammenhängt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Methode und die Kombination der Oberflächenmarker eine Darstellung der Mastzellen in den verschiedenen Organen abbilden kann und auch den Weg der Zelle durch den Körper. Wie in der Diskussion kritisch betrachtet, können zwar die Ergebnisse reproduziert werden, jedoch müssen weitere Experimente folgen, um die dargestellten Ergebnisse zu verifizieren. In dieser Arbeit wurden etablierte Methoden verlassen, und Ergebnisse, die bis lang nur *in vitro* gezeigt wurden, *in vivo* dargestellt ohne dass Zwischenschritte *in vitro* erfolgten.

5 Literaturangaben

- [1] Krams M, Frahm SO, Kellner U, Mawrin C. Kurzlehrbuch Pathologie. Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag, 2010
- [2] Schmetzer O. Immunologie. Reihe Basics, 1. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag, 2009
- [3] Lanza R, Atala A. Essentials of Stem Cell Biology. 3. Edition. Amsterdam/Boston: Elsevier, 2013
- [4] Schmidt RF, Unsicker K. Lehrbuch Vorklinik. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 2003
- [5] Barrett KE, Pearce FL. Heterogeneity of mast cells. In: Uvnäs B, Ed. Histamine and Histamine Antagonists. Aus der Reihe: Handbook of experimental pharmacology. Berlin/Heidelberg: Springer Verlag, 1991:93-117
- [6] Huntley J.F. Mast cells and basophils: a review of their heterogeneity and function. J Comp Pathol 1992;107:349-372
- [7] Dahlin JS, Hallgren J. Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. Molecular Immunology 2015;63(1):9-17
- [8] Kitamura Y, Go S, Hatanaka K. Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. Blood 1978;52(2):447-452
- [9] Kitamura Y, Go S. Decreased production of mast cells in S1/S1d anemic mice. Blood 1979;53(3):492-497
- [10] Gurish MF, Boyce JA. Mast cells: Ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell. J Allergy Clin Immun 2006;117(6):1285-1291
- [11] Huang H, Li Y. Mechanisms Controlling Mast Cell and Basophil Lineage Decisions. Curr Allergy Asthm R 2014;14(9):457
- [12] Chen CC, Grimbaldston MA, Tsai M, Weissman IL, Galli SJ. Identification of mast cell progenitors in adult mice. P Natl Acad Sci USA 2005;102:11408-11413

- [13] Franco CB, Chen CC, Drukker M, Weissman IL, Galli SJ. Distinguishing Mast Cell and Granulocyte Differentiation at the Single-Cell Level. *Cell Stem Cell* 2010;6(4):361-368
- [14] Fiedler K, Brunner C. The role of transcription factors in the guidance of granulopoiesis. *Am J Blood Res.* 2012;2(1):57-65
- [15] Hallgren J, Gurish MF. Pathways of murine mast cell development and trafficking: tracking the roots and routes of the mast cell. *Immunol Rev* 2007;217(1):8-18
- [16] Pearce FL. On the heterogeneity of mast cells. *Pharmacology* 1986;32(2):61-71
- [17] Kuriu A, Sonoda S, Kanakura Y, Jozaki K, Yamatodani A, Kitamura Y. Proliferative potential of degranulated murine peritoneal mast cells. *Blood* 1989;74(3):925-929
- [18] Ehrlich P. Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten. *Arch Anat Physiol* 1878;3:166-169
- [19] Von Recklinghausen FD. Die Lymphgefäße und ihre Beziehung zum Bindegewebe. Berlin: Verlag von August Hirschwald, 1862
- [20] Galli SJ, Maurer M, Lantz CS. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1999;11(1):53-59
- [21] Galli SJ. Mast cells and basophils. *Curr Opin Hematol* 2000;7(1):32-39
- [22] Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005;6(2):135-142
- [23] Metcalfe DD, Boyce JA. Mast cell biology in evolution. *J Allergy Clin Immun* 2006;117(6):1227-1229
- [24] Riley JF. The riddle of the mast cell: a tribute to Paul Ehrlich. *Lancet* 1954;263(6817):841-844
- [25] Collington SJ, Williams TJ, Weller CL. Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissue. *Trends Immunol* 2011;32(10):478-485
- [26] Botchkarev VA, Eichmüller S, Peters EMJ, Pietsch P, Johansson O, Maurer M, Paus

- R. A simple immunofluorescence technique for simultaneous visualization of mast cells and nerve fibers reveals selectivity and hair cycle-dependent changes in mast cell-nerve fiber contacts in murine skin. *Arch Dermatol Res* 1997;289(5):292-302
- [27] Cindik ED, Maurer M, Hannan MK, Müller R, Hayes WC, Hovy L, Kurth AA. Phenotypical characterization of c-kit receptor deficient mouse femora using non-destructive high-resolution imaging techniques and biomechanical testing. *Technol Health Care* 2000;8(5):267-275
- [28] Sawatsubashi M, Yamada T, Fukushima N, Mizokami H, Tokunaga O, Shin T. Association of vascular endothelial growth factor and mast cells with angiogenesis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2000;436(3):243-248.
- [29] Padawer J. Editorial: the ins and outs of mast cell function. *Am J Anat* 1974;141(3):299-302
- [30] Enerbäck L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 1. Effects of fixation. *Acta Pathol Mic Sc* 1966;66(3):289-302
- [31] Irani AMA, Schlechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *P Natl Acad Sci USA*. 1986;83(12):4464-4468
- [32] Irani AMA, Bradford TR, Kepley CL, Schechter NM, Schwartz LB. Detection of MC(T) and MC(TC) types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J Histochem Cytochem* 1989;37(10):1509-1515
- [33] Miller JS, Schwartz LB. Human mast cell proteases and mast cell heterogeneity. *Curr Opin Immunol* 1988-1989;1(4):637-642
- [34] Schwartz LB. Analysis of MC(T) and MC(TC) mast cells in tissue. In: Krishnaswamy G, Chi DS, Eds. *Mast Cells. Aus der Reihe: Methods in Molecular Biology*, vol 315. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2006:53-62
- [35] Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast Cells. *Physiol Rev* 1997;77(4):1033-1079
- [36] Murphy KM, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie*. 7. Auflage. Heidelberg:

Spektrum Verlag, 2009

- [37] Denzel AJ. Bedeutung basophiler Granulozyten für das Zustandekommen einer humoralen Gedächtnisimmunantwort. Dissertation zur Erlangung des Dr. rer.nat., Naturwissenschaftliche Fakultät III der Universität Regensburg, 2010
- [38] Iikura M, Suto H, Kajiwara N, Oboki K, Ohno T, Okayama Y, Saito H, Galli SJ, Nakae S. IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab Invest* 2007;87(10):971-978
- [39] Church MK, el-Lati S, Caulfield JP. Neuropeptide-induced secretion from human skin mast cells. *Int Arch Allergy Immun* 1991;94(1-4):310-318
- [40] Arinobu Y, Iwasaki H, Gurish MF, Mizuno SI, Shigematsu H, Ozawa H, Tenen DG, Austen KF, Akashi K. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(50):18105-18110
- [41] Maurer M, Lopez Kostka S, Siebenhaar F, Moelle K, Metz M, Knop J, von Stebut E. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. *FASEB J* 2006;20(14):2460-2467
- [42] Welker P. Die Rolle der Mastzelle im zytokinen Netzwerk der Haut. Habilitationsschrift, vorgelegt der medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität Berlin, 2003
- [43] Longley J, Duffy TP, Kohn S. The mast cell and mast cell disease. *J Am Acad Dermatol* 1995;32(4):545-561
- [44] Yu M, Tsai M, Tam SY, Jones C, Zehnder J, Galli SJ. Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice. *J Clin Invest* 2006;116(6):1633-1641
- [45] Padawer, J. The mast cell and immediate hypersensitivity. In: Bach MK, ed. *Immediate Hypersensitivity*. New York: M. Decker Inc., 1978:301-367
- [46] Dahme E, Weiss E. *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. 6. völlig neu bearbeitete Ausgabe. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2007

- [47] Johnson D, Seeldrayers PA, Weiner HL. The role of mast cells in demyelination. 1. Myelin proteins are degraded by mast cell proteases and myelin basic protein and P2 can stimulate mast cell degranulation. *brain res* 1988;444(1):195-198
- [48] Ibrahim MZ, Reder AT, Lawand R, Takash W, Sallouh-Khatib S. The mast cells of the multiple sclerosis brain. *J Neuroimmunol* 1996;70(2):131-138
- [49] Kneilling M, Mailhammer R, Hültner L, Schönberger T, Fuchs K, Schaller M, Bukala D, Massberg S, Sander CA, Braumüller H, Eichner M, Maier KL, Hallmann R, Pichler BJ, Haubner R, Gawaz M, Pfeffer K, Biedermann T, Röcken M. Direct crosstalk between mast cell-TNF and TNFR1-expressing endothelia mediates local tissue inflammation. *Blood* 2009;114(8):1696-1706
- [50] Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB. Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* 2002;297(5587):1689-1692
- [51] Echtenacher B, Männel DN, Hültner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 1996;381(6577):75-77
- [52] Horny HP, Sotlar K, Valent P, Hartmann K. Die Mastozytose. Eine Erkrankung der hämopoetischen Stammzelle. *Dtsch Arztebl* 2008;105(40):686-692
- [53] Hallgren J, Gurish MF. Mast cell progenitor trafficking and maturation. In: Gilfillan AM, Metcalfe DD, Eds. *Mast Cell Biology. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 716. Boston, MA: Springer, 2011:14-28
- [54] Pennock JL, Grecis RK, Zsebo KM, Orlic D. In vivo exit of c-kit⁺/CD49d(hi)/beta7⁺ mucosal mast cell precursors from the bone marrow following infection with the intestinal nematode *Trichinella spiralis*. *Blood* 2004;103(7):2655-2660
- [55] Kumamoto T, Shalhevet D, Matsue H, Mummert ME, Ward BR, Jester JV, Takashima A. Hair follicles serve as local reservoirs of skin mast cell precursors. *Blood* 2003;102(5):1654-60
- [56] Nakano T, Sonoda T, Hayashi C, Yamatodani A, Kanayama Y, Yamamura T, Asai H, Yonezawa T, Kitamura Y, Galli SJ. Fate of bone marrow-derived cultured mast cells

- after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient W/W^v mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *J Exp Med* 1985;162(3):1025-1043
- [57] Tsai M, Tam SY, Wedemeyer J, Galli SJ. Mast cells derived from embryonic stem cells: a model system for studying the effects of genetic manipulations on mast cell development, phenotype, and function in vitro and in vivo. *Int J Hematol* 2002;75(4):345-349
- [58] Cyphert JM, Kovarova M, Koller BH. Unique populations of lung mast cells are required for antigen-mediated bronchoconstriction. *Clin Exp Allergy* 2011;41(2):260-269
- [59] Kobayashi T, Nakano T, Nakahata T, Asai H, Yagi Y, Tsuji K, Komiyama A, Akabane T, Kojima S, Kitamura Y. Formation of mast cell colonies in methylcellulose by mouse peritoneal cells and differentiation of these cloned cells in both the skin and the gastric mucosa of W/W^v mice: evidence that a common precursor can give rise to both "connective tissue-type" and "mucosal" mast cells. *J Immunol* 1986;136(4):1378-84.
- [60] Kitamura Y, Sonoda T, Nakano T, Kanayama Y. Probable dedifferentiate of mast cells in mouse connective tissues. *Curr Top Dev Biol.* 1986;20(C):325-332.
- [61] Kitamura Y, Kanakura Y, Sonoda S, Asai H, Nakano T. Mutual phenotypic changes between connective tissue type and mucosal mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1987;82(3-4):244-248.
- [62] Westerberg CM, Ullerås E, Nilsson G. Differentiation of mast cell subpopulations from mouse embryonic stem cells. *J Immunol Methods* 2012;382(1-2):160-166
- [63] Jamur MC, Oliver C. Origin, maturation and recruitment of mast cell precursors. *Front Biosci* 2011;3:1390-1406
- [64] Gorku G, Rivera-Nieves J, Ley K. Role of $\beta 7$ integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr Mol Med* 2009;9(7): 836-850
- [65] Dahlin JS, Heymann B, Hallgren J. Committed mast cell progenitors in mouse blood

- differ in maturity between Th1 und Th2 strains. *Allergy* 2013;68(10):1333-1337
- [66] Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005;23(5):479-490
- [67] Terada T, Matsunaga Y. Increased mast cells in hepatocellular carcinoma and intra-hepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2000;33(6):961-966
- [68] Student. The Probable Error of a Mean. *Biometrika* 1908;6(1):1-25
- [69] Welch BL. The generalization of ,Student's' problem when several different population variances are involved. *Biomterika* 1947;34(1-2):28-35
- [70] Delacre M, Lakens D, Leys C. Why Psychologists should by default use Welch's t-test instead Student's t-test. *International Review of social Psychology* 2017;30(1):92-101
- [71] Kitamura Y, Yokoyama M, Sonoda T, Mori KJ. Different radiosensitivities of mast-cell precursors in the bone marrow an skin of mice. *Radiat Res* 1983;93(1):147-156
- [72] Gitzelmann S. Etablierung der intrahepatischen Stammzelltransplantation bei neugeborenen Mäusen. Inaugural-Dissertation der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximillians-Universität München, München 2011
- [73] Shi C, Mai Y, Cheng T. Identification of hematopoietic cell populations from the dermal papillae of human hair follicles. *Transpl P* 2004;36(10):3208-3211
- [74] Kube P. Canine Mastzellen: Verteilung, Dichte und Hetrogenität sowie Einfluss zweier Fixationstechniken. Dissertation zur Erlangung des Dr. vet. an der Freien Universität Berlin, 1999

6 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Silke Naumann d'Alnoncourt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Darstellung und Charakterisierung von Mastzell-Vorläuferzellen in der Maus unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

7 Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. M. Maurer für die Aufnahme in seine Forschungsgruppe und Ermöglichung dieser Dissertation ganz herzlich bedanken. Ich möchte mich besonders bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. F. Siebenhaar bedanken. Seine wertvollen Ideen, Anregungen und Korrekturen waren essentiell für die Entstehung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Sina Heydrich bedanken. Ihre stetige Unterstützung und praktische Anleitung waren für mich eine große Hilfe.

Insbesondere möchte ich mich bei ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Labors für Einarbeitung in die Labortätigkeit sowie für die vielen guten Ratschläge bedanken.

Weiterhin möchte ich an dieser Stelle an die Mäuse erinnern, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

Ich möchte mich bei meiner gesamten Familie bedanken. Vor allem meinem Ehemann Raoul, der nicht müde wurde mich zu unterstützen.